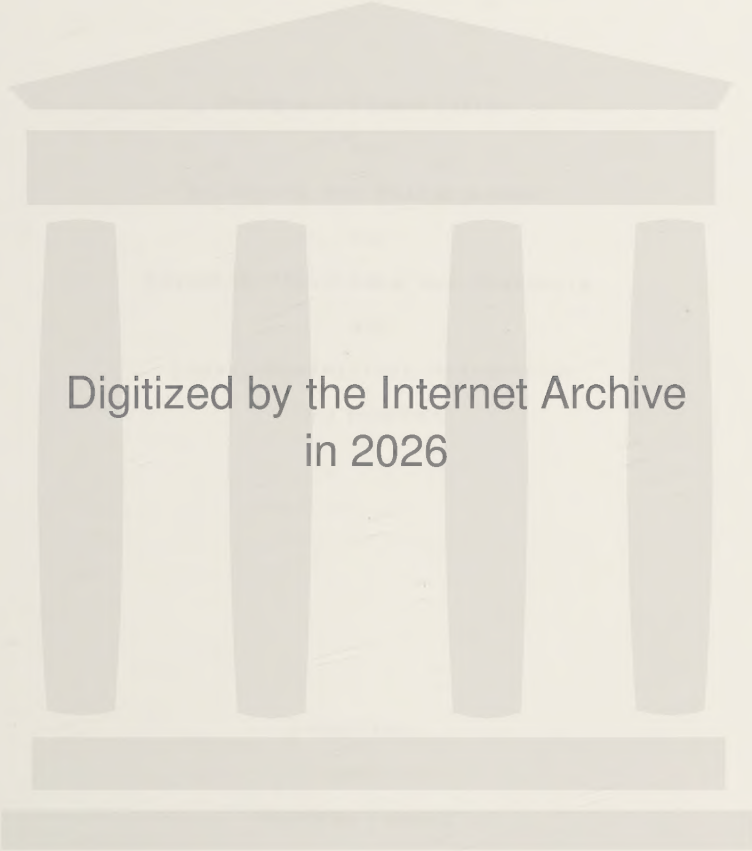


STRUKTUR UND STEREOCHEMIE
NEUER FLAVONOLIGNANE
AUS EINER WEISSBLÜHENDEN VARIETÄT
VON SILYBUM MARIANUM (L.) GAERTN.

MANFRED FIEBIG

Diss. München
1903





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0023

Struktur und Stereochemie neuer Flavonolignane aus einer
weißblühenden Varietät von Silybum marianum (L.) Gaertn.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Manfred Fiebig

aus

Neu-Ulm

Dezember 1983

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 1983

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
Teil I - <i>Silybum marianum</i> L. var. alb.	2
1. Kenntnisstand über <i>Silybum marianum</i>	2
1.1. Systematik und Verbreitung	2
1.2. Botanische Beschreibung	3
1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe	5
2. Eigene Untersuchungen	7
2.1. Chromatographische Voruntersuchung	7
2.2. Orientierende chemische und spektroskopische Untersuchungen	9
2.3. Extraktion	12
2.4. Anreicherung	13
2.5. Isolierung von Flavon G	13
2.6. Auftrennversuche von Flavon G	14
2.6.1. Dünnschichtchromatographie	14
2.6.2. HPLC- Hochleistungsflüssigchromatographie . .	16
2.7. Präparative HPLC	18
2.7.1. HPLC-Fraktionierung	18
2.7.2. Versuche zur Strukturaufklärung von Fraktion G/A und Fraktion G/B	21
2.8. Acetylierung	22
2.9. Isolierung der drei Komponenten von Flavon G .	24
2.9.1. Isolierung von Flavon-A-acetat	24
2.9.2. Isolierung von Flavon-B ₁ -acetat und Flavon-B ₂ - acetat	24
3. Zuordnung von Flavon-B ₁ - und Flavon-B ₂ -acetat .	26
4. Strukturaufklärung	28
4.1. Flavon-A-acetat	28
4.2. Flavon-B ₁ -acetat	39

	Seite
4.3. Flavon-B ₂ -acetat	45
5. Stereochemie	53
5.1. Stereochemie bisher bekannter Flavonolignane .	53
5.2. Bestimmung der optischen Drehung	56
5.3. Bestimmung des Circular dichroismus (CD)	58
5.4. ¹ H-NMR-Spektroskopie	62
5.4.1. Bestimmung der Konfigurationen im Dihydrobenzofuranring	62
5.4.2. Bestimmung der Konformation	70
6. Weitere neue Inhaltsstoffe	72
6.1. Eriodictyol	72
6.2. Naringenin	74
6.3. Apigenin und Chrysoeriol	77
7. Vergleichende HPLC-Untersuchung beider Silybum-Varietäten	80
Teil II - Pharmakologisches Screening	85
1. Auswahl der Testmethoden	85
2. Allgemeine Testmethoden	86
2.1. In-vivo-Lebertest an CCl ₄ -geschädigten Ratten .	86
2.2. In-vitro-Test auf Leberschutzwirkung nach CCl ₄ -und Galactosamin-Schädigung	86
2.3. Stimulierung der Polymerasen A und B	87
2.4. In-vivo-Test an Phalloidin- bzw. α-Amanitin-geschädigten Mäusen	87
3. Bisherige Untersuchungen an Silybum-Wirkstoffen	87
4. Testung der Silybum-Wirkstoffe im Hepatozyten-Modell	89
5. Drogenscreening	94
5.1. Übersicht	94
5.2. Butea monosperma	95
5.3. Eclipta alba	104
5.4. Wedelia calendulacea	111

5.5.	Lophophytum leandri (= Flor de Piedra)	112
5.6.	Picrorhiza kurroa	114
Z U S A M M E N F A S S U N G		116
E X P E R I M E N T E L L E R T E I L		119
1.	Herkunft des Drogenmaterials	119
2.	Herkunft der Vergleichssubstanzen	120
3.	Allgemeine Arbeitsmethoden	120
3.1.	Dünnschichtchromatographie	120
3.1.1.	Adsorbentien	120
3.1.2.	Laufmittelsysteme	121
3.1.3.	Detektion	121
3.2.	Säulenchromatographie	122
3.2.1.	Adsorbens	122
3.2.2.	Laufmittel	122
3.2.3.	Packtechnik	122
3.3.	HPLC	123
3.3.1.	Analytische HPLC	123
3.3.2.	Präparative HPLC	125
3.4.	Physikalisch-chemische Untersuchungen	126
4.	Chemische Verfahren	128
4.1.	Hydrolyse der BuOH-Fraktion von Butea mono- sperma	128
4.2.	Acetylierungen	128
4.3.	Permethylierung nach BRIMACOMBE	129
5.	Spezielle Arbeitsmethoden	129
5.1.	Untersuchung von Silybum marianum var. alb.	129
5.1.1.	Extraktion	130
5.1.2.	Anreicherung	130
5.1.3.	Isolierung von Flavon G	131
5.1.4.	HPLC-Fraktionierung	131
5.1.5.	Acetylierung	132
5.1.6.	Isolierung von Flavon-A-acetat	132

5.1.7.	Physikalische Daten von Flavon A, bzw. Flavon-A-acetat	133
5.1.8.	Isolierung von Flavon-B ₁ -acetat und Flavon-B ₂ - acetat	135
5.1.9.	Physikalische Daten von Flavon-B ₁ -acetat . .	135
5.1.10.	Physikalische Daten von Flavon-B ₂ -acetat . .	137
5.1.11.	Isolierung von Eriodictyol	138
5.1.12.	Physikalische Daten von Eriodictyol	139
5.1.13.	Isolierung von Naringenin ("Substanz E") . . .	139
5.1.14.	Physikalische Daten von Naringenin ("Substanz E")	140
5.1.15.	Isolierung von Chrysoeriol und Apigenin ("Flavon Z")	141
5.1.16.	Physikalische Daten von Chrysoeriol und Apigenin ("Flavon-Z"-Gemisch)	141
5.2.	Untersuchung von Butea monosperma	143
5.3.	Untersuchung von Eclipta alba	143
5.4.	Untersuchung von Wedelia calendulacea	144
5.5.	Untersuchung von Lophophytum leandri (Flor de Piedra)	145
5.6.	Untersuchung von Picrorhiza kurroa	145
5.7.	Pharmakologische Untersuchungen	145
5.7.1.	In-vivo-Lebertest an CCl ₄ -geschädigten Ratten	145
5.7.2.	In-vitro-Test auf Leberschutzwirkung nach CCl ₄ - und Galaktosaminschädigung nach HIKINO .	146
5.7.3.	Stimulierung der Polymerasen A und B nach SONNENBICHLER	147
5.7.4.	In-vivo-Test an Phalloidin- bzw. α-Amanitin- geschädigten Mäusen	148
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S		149

E I N L E I T U N G

Das Silymarin, ein Flavonolignangemisch aus den Früchten von *Silybum marianum*, gehört zu den wirksamsten Leberpräparaten pflanzlichen Ursprungs. Darüber hinaus besitzen diese Flavonolignane eine Organspezifität, wie sie bisher bei keinem natürlichen oder synthetischen Leberschutzstoff beobachtet wurde. Untersuchungen über Struktur-Wirkungsbeziehungen innerhalb dieser Stoffklasse und bei Flavonoiden allgemein gehören daher zu den derzeit vordringlichsten Aufgaben.

Nachdem kürzlich aus einer weißblühenden Varietät von *Silybum marianum* neue Flavonolignane isoliert werden konnten und orientierende DC-Untersuchungen auf die Anwesenheit weiterer Verbindungen hinwiesen, sollten zunächst diese neuen Verbindungen isoliert und strukturell aufgeklärt werden. Die Klärung der Stereochemie der neu und früher isolierten Verbindungen dieser Reihe war eine weitere Aufgabe. Schließlich sollte durch Screening-Untersuchungen geprüft werden, welche anderen in der Literatur als antihepatotoxisch beschriebenen "Leberdrogen" als geeignete Kandidaten für phytochemische Untersuchungen in Frage kamen.

A L L G E M E I N E R T E I L

Teil I - Silybum marianum L. var. alb.

1. Kenntnisstand über Silybum marianum

1.1. Systematik und Verbreitung

Das untersuchte Pflanzenmaterial stammt von einer weißblühenden Varietät der Art Silybum marianum (L.) Gaertn. (= *Carduus marianum* L., = *Mariana mariana* L. Hill.) (1). Die Gattung *Silybum* umfaßt nur zwei Arten. Außer der angeführten wird noch die westmediterrane *Silybum eburneum* Cosson et Durieu beschrieben (2). *Silybum marianum* gehört innerhalb der Familie der Asteraceae zur Unterfamilie der Asteroidae (2). Die im deutschen Sprachraum vor allem als Mariendistel bezeichnete Pflanze ist in England als "milk-thistle" und in Frankreich als "silybe" oder "chardon Marie" bekannt (1).

Während *Silybum marianum* als thermophile Pflanze ursprünglich in mediterran-vorderasiatischen Steppen- und Buschgebieten beheimatet war, ist sie verwildert in ganz Mitteleuropa anzutreffen. Inzwischen zählen zu ihren Verbreitungsgebieten auch der amerikanische Kontinent und Australien (1, 2).

Die Pflanze bevorzugt trockene, nährstoffreiche Böden und tritt im mitteleuropäischen Bereich vereinzelt oder in Gruppen auf. Unter günstigen äußeren Bedingungen kann es zur Ausbildung regelrechter "Distelwälder" kommen (1).

Daß bereits früh versucht wurde, die Mariendistel wegen der ihr zugeschriebenen Heilwirkung zu kultivieren, belegt ein Bericht von HAGEN, nach dem die Mariendistel

im 18. Jahrhundert in Ostpreußen ihrer Früchte wegen allgemein angebaut wurde (1).

Bereits 1866 beschrieben JORDAN und FOURREAU das Vorkommen einer weißen *Silybum*-Varietät (3). Im Jahre 1929 wurde von FIORI erwähnt, daß neben den gewöhnlich violettblühenden Pflanzen gelegentlich auch solche mit weißen Blüten zu beobachten sind (4).

Die von uns untersuchte weißblühende Varietät dieser Droge wird heute in den Niederlanden und Ungarn in Kultur angebaut (5).

1.2. Botanische Beschreibung

Silybum marianum ist eine ein- bis zweijährige, bis zu 1.50 m hoch wachsende Distelpflanze. Der meist verzweigte Stengel ist im oberen Teil zerstreut und filzig behaart. Die ovalen, glänzend grünen Blätter sind den Nervenbahnen entlang auf charakteristische Weise hell gefleckt und in breite dreieckige, stachelig gezeichnete Abschnitte unterteilt. Die etwa 4 cm langen Köpfe sitzen einzeln aufrecht oder etwas nickend (2).

Erst kürzlich angestellte vergleichende Untersuchungen zeigten, daß mit Ausnahme der Blütenfarbe keine signifikanten makro- und mikromorphologischen Unterschiede bei den beiden *Silybum-marianum*-Varietäten existieren (6).

Die Früchte der Mariendistel, die die eigentliche Droge darstellen, werden 6 bis 7 mm lang. Ihre Oberfläche ist glatt und braun gefleckt (1).





Abb. 1

S I L Y B U M M A R I A N U M (L .) G A E R T N .

Habituszeichnung aus "Flora der Schweiz" (2)

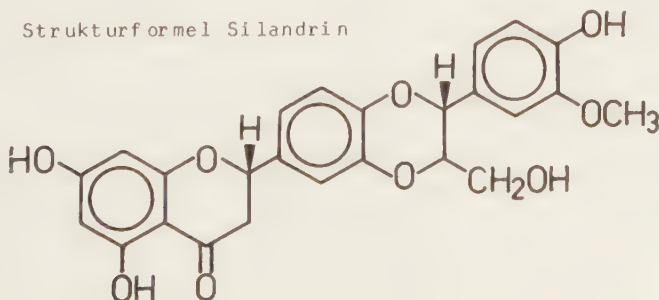
1.3. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Im Gegensatz zur ausführlich chemisch und pharmakologisch bearbeiteten violettblühenden *Silybum-marianum*-Droge (7 - 11) war der weißblühenden Varietät bis vor kurzem keine Beachtung geschenkt worden. 1977 beobachteten STIEBER u. Mitarb. auf Grund von DC-Untersuchungen zum erstenmal, daß sich das Inhaltsstoffmuster dieser Varietät von dem der violettblühenden stark unterschied. Während Silybin und Silydianin nicht vorkamen, war als Hauptinhaltsstoff ein bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Flavonoid nachweisbar, das als SA-Substanz bezeichnet wurde (12).

SZILAGYI u. Mitarb. isolierten 1978 neben dieser Substanz einen zweiten Inhaltsstoff, der zunächst die Bezeichnung SB-Substanz trug (13). Daß es sich bei diesen Verbindungen offensichtlich um zwei neue Vertreter der Flavonolignanklasse handelte, machten erste analytische Untersuchungen deutlich.

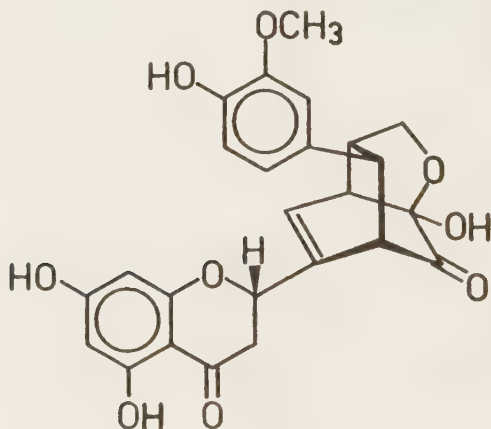
1981 erfolgte die endgültige Strukturaufklärung dieser nun als Silandrin (= SB) und Silymonin (= SA) bezeichneten Substanzen (5). Mit Hilfe von MS- und NMR-Untersuchungen sowie synthetischen Arbeiten konnte in unserem Arbeitskreis eindeutig bewiesen werden, daß Silandrin der Isosilybin-Reihe angehört und die Struktur eines 3-Desoxy-Isosilybins besitzt (Abb. 2).

Abb. 2: Strukturformel Silandrin



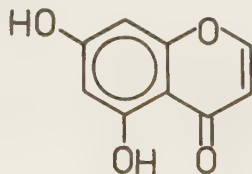
Für Silymonin konnte auf Grund der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten die Struktur eines 3-Desoxy-Silydianins abgeleitet werden (Abb. 3).

Abb. 3: Strukturformel Silymonin



Außerdem ließ sich im Extrakt dieser Droge eine dritte Substanz nachweisen, die durch ihr ^1H -NMR-Spektrum als 5,7-Dihydroxychromon identifiziert wurde (5)(Abb. 4).

Abb. 4: Strukturformel 5,7-Dihydroxychromon



2. Eigene Untersuchungen

2.1. Chromatographische Voruntersuchung

Da sich in einer orientierenden DC-Untersuchung gezeigt hatte, daß neben den beiden Flavonolignanen Silandrin und Silymonin noch weitere in *Silybum marianum* bisher nicht beschriebene Flavonoide vorlagen, versuchten wir, auch diese zu isolieren.

Für diese Analyse standen uns zunächst nur 30 g methanolischer Rohextrakt zur Verfügung.⁺⁾ Ein dünnschichtchromatographischer Vergleich dieses Extrakts mit dem der violettblühenden Varietät ergab folgendes Bild (Abb. 5, S. 8):

⁺⁾ Dieser Extrakt war im November 1980 in unserem Institut von aus Ungarn stammenden Früchten der weißblühenden *Silybum*-Varietät hergestellt worden.

Abb. 5: DC-Vergleich der MeOH-Rohextrakte beider
Silybum-Varietäten



LM: CHCl₃-Aceton-HCOOH
9 : 2 : 1

Det.: a) UV 254
b) Naturstoff-
PÄG-Reagenz

Zuordnung:

weiß:

- 1 = unbekannt
- 2 = Silymonin
- 3 = unbekannt
- 4 = Silandrin
- 5 = unbekannt
- 6 = unbekannt
- 7 = 5,7-Dihydroxychromon

violett:

- 1 = Silychristin
- 2 = Isosilychristin
- 3 = Taxifolin
- 4 = Silydianin
- 5 = Isosilybin
- 6 = Silybin
- 7 = Dehydroisilybin

Auf der DC war unterhalb von Silymonin eine Zone (Nr. 1) mit starker Fluoreszenzminderung zu beobachten, die keinem bisher beschriebenen Inhaltsstoff aus *Silybum* vom R_f -Wert her entsprach. Nach Besprühen mit Naturstoff-PÄG-Reagenz fluoreszierte sie im UV 360 mit ähnlich gelborangem Farbton wie Silandrin. Detektierte man mit FeCl_3 -Lösung, so entstand eine braungrüne Färbung, die auf eine phenolische Verbindung deutete.

Die anderen Zonen (Nr. 3 - 7) lagen im R_f -Bereich 0.6 - 0.8, in dem der Extrakt der violettblühenden Varietät nur die Zone des Dehydrosilybins aufwies.

2.2. Orientierende chemische und spektroskopische Untersuchungen

Zur Isolierung der als Flavon G bezeichneten Verbindung (Zone Nr. 1) trennten wir in einem ersten Schritt 5 g des Rohextrakts auf einer Kieselgelsäule mit CH_2Cl_2 -Aceton im Volumenverhältnis 2 : 1 auf. Da nur eine teilweise Abtrennung von einer nachfolgenden Verbindung gelang, setzten wir zur Reinisolierung von Flavon G die präparative Dünnschichtchromatographie ein. Für diesen Zweck benutzten wir Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 0.5 mm und zum Entwickeln das Fließmittel Toluol-Aceton-Ameisensäure 9 : 2 : 1. Die im kurzwelligen UV-Licht detektierten Zonen lieferten nach Elution mit Aceton 70 mg reines Flavon G.

Nach dem positiven Ausfall des Testes nach SHINODA (14) sollte eine Flavonverbindung vorliegen.

Der Shinoda-Test, der bei Flavanonen und Flavanonolen zur Bildung eines roten Farbstoffs führt, beruht auf der Reduktion des Moleküls nach Zugabe von Magnesium und HCl. PEW beobachtete, daß bei der Verwendung von Zinkstaub anstelle des Magnesiums nur Flavanonole mit der Bildung eines tiefroten Reduktionsprodukts reagieren, wogegen Flavanone keine oder nur äußerst schwache Färbungen ergeben (15).

Nachdem die Substanz in der Modifikation nach PEW keine Verfärbung ergab, war das Vorliegen eines Flavanons wahrscheinlich.

Auch das UV-Spektrum von Flavon G mit einem Maximum bei 288 nm zeigte das typische Bild eines Flavanons. Auf Zugabe von AlCl_3 erfolgte eine bathochrome Verschiebung des Maximums um 23 nm, die sich auch nach darauffolgender Zugabe von HCl als beständig erwies. Dieses Verhalten war ein sicheres Zeichen dafür, daß eine freie 5-OH-Gruppe im Molekül vorlag (16).

Versetzte man die methanolische Meßlösung mit NaOMe , so verschob sich das Maximum nach 325 nm. Dieser Effekt sprach dafür, daß neben einer 5-OH- auch eine freie 7-OH-Gruppe vorlag. Damit war als Grundgerüst das eines 5,7-Dihydroxyflavanons wahrscheinlich (16).

Diesem Strukturtyp entsprach auch das IR-Spektrum mit Hauptbanden bei 3420 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} . Im Fingerprint-Bereich ähnelte das Spektrum in starkem Maße dem der Flavonolignane, sodaß zumindest Teilstrukturen jener Verbindungsklasse zu erwarten waren.

Im Massenspektrum erschien der Molekülpeak bei m/e 466, sodaß Flavon G dieselbe Masse wie Silandrin und Silymonin besaß. In den weiteren Fragmentierungsschritten zeigten sich ebenfalls Ähnlichkeiten mit den Flavonolignanen (Tab. 1, S. 11). An dem Fragmentierungsmuster unterhalb von m/e 180 ließ sich eindeutig die Anwesenheit einer Coniferylalkohol-einheit erkennen (17).

Danach entsteht aus Coniferylalkohol (M^+ 180) durch C-O -Verlust zunächst ein Fragment mit m/e 152, das weiter in kleinere Bruchstücke zerfällt. Parallel dazu sind zwei Fragmentierungsprozesse mit gleichzeitiger Umlagerung eines Wasserstoffatoms zu erkennen. Während der eine Weg zur Bildung eines Ions mit Chinonmethin-Struktur führt, das bei m/e 137

registriert wird und den Basispeak des Spektrums von Coniferylalkohol liefert, wird das Signal bei m/e 124 offenbar durch Abspaltung der aliphatischen Seitenkette hervorgerufen.

Tab. 1: Vergleich der MS-Daten von Silandrin, Silymonin und Flavon G (5)

Silandrin	Silymonin	Flavon G
m/e (% rel.Int.)	m/e (% rel.Int.)	m/e (% rel.Int.)
466 (67)	466 (1)	466 (6)
448 (25)	438 (3)	448 (20)
329 (11)	379 (1)	436 (10)
299 (14)		296 (18)
288 (8)	288 (2)	283 (18)
205 (2)		270 (22)
180 (100)	180 (11)	
179 (14)	179 (7)	
162 (50)		
161 (17)		
153 (39)	153 (100)	153 (100)
150 (15)		
147 (28)		
137 (91)	137 (8)	137 (48)
124 (55)	131 (6)	124 (18)
119 (17)		
91 (19)	91 (4)	91 (10)
78 (14)	58 (4)	81 (14)
		77 (15)

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, stimmte das Fragmentierungsmuster von Flavon G in weiten Teilen mit dem von Silandrin überein. Auffallend war, daß das vom Coniferylalkohol stammende Signal bei m/e 180 in der isolierten Substanz fehlte. Allerdings sind Beispiele für ein derartiges Verhalten bei den Flavonolignanen bekannt (10).

2.3. Extraktion

Da die isolierte Substanzmenge für die völlige Struktur- aufklärung nicht ausreichte und nicht sicher war, ob die isolierte Substanz ein durch Lagerung oder andere Einflüsse bedingtes Artefakt darstellte, stellten wir selbst aus den Früchten der weißblühenden Silybum-Varietät eine größere Menge an MeOH-Extrakt her.

Aus 750 g zerkleinerter Droge erhielten wir 60 g eines pulverisierbaren Trockenextrakts. Der DC-Vergleich des von uns hergestellten MeOH-Extrakts mit dem gelieferten zeigte, daß

- beide Auszüge vom Inhaltsstoffmuster her identisch waren, und
- die Substanz Flavon G somit kein Artefakt, sondern einen bislang nicht bekannten Inhaltsstoff von Silybum marianum darstellte.

2.4. Anreicherung

Durch das angewandte Extraktionsverfahren waren neben der gesuchten Substanz vor allem die Flavonolignane Silandrin und Silymonin miterfaßt worden. Im nächsten Schritt galt es, Flavon G von diesen Stoffen abzutrennen oder zumindest eine Anreicherung vorzunehmen.

Eine Ausschüttelung mit Ethylacetat brachte keine Anreicherung von Flavon G. Diese gelang durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit CH_2Cl_2 -Aceton (2 : 1) als Elutionsmittel. Die Flavon G enthaltenden Fraktionen lieferten Fraktion I.

Das auf gleiche Weise aus dem zur Voruntersuchung verwendeten Rohextrakt abgetrennte Flavon-G-haltige Substanzgemisch wurde als Fraktion II bezeichnet.

Damit standen für die Reindarstellung von Flavon G zwei Fraktionen aus unterschiedlichen Drogenchargen zur Verfügung.

2.5. Isolierung von Flavon G

Da Silymonin und Flavon G nur einen sehr geringen R_f -Unterschied aufwiesen, versuchten wir die präparative Dünnschichtchromatographie mit handelsüblichen Kieselgelplatten von 0,5 mm Schichtdicke.

Als Laufmittel hatten verschiedene Autoren (5, 10, 18) für die DC-Isolierungen von Silybum-Inhaltsstoffen das von DIESEL (19) entwickelte System CHCl_3 -Aceton-Ameisensäure im Verhältnis 9 : 2 : 1 (= LM I) verwendet. Der Zusatz von Säure war notwendig, da ohne diesen die Auftrennung durch Überlappung stark beeinträchtigt worden wäre. Für das präparative Arbeiten bedeutet der Säureanteil jedoch die Gefahr

der partiellen Hydrolyse bzw. Zersetzung. Deshalb mußte ein Laufmittelsystem ohne Säurezusatz entwickelt werden. Durch Abwandlung eines Systems, das aus der DCC-Chromatographie stammt (20), fanden wir ein Laufmittel, das sich für die gestellten Anforderungen als besonders gut geeignet erwies. Durch Verwendung der Unterphase des Systems CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O im Volumenverhältnis 14 : 6 : 4 konnte Flavon G auf der DC von den übrigen Inhaltsstoffen sauber abgetrennt werden.

Aus 40 Kieselgelplatten erhielten wir nach Elution mit Aceton und Membranfiltration 300 mg Flavon G. Eine anschließende Nachelution des Kieselgels mit der polareren Lösungsmittelmischung Aceton-MeOH 1 : 1 brachte keine weiteren Ausbeuten an Flavon G.

Auf gleiche Weise wurde aus der Silybum-Fraktion II nach Auftrennung über 20 Kieselgelplatten 100 mg Flavon G gewonnen.

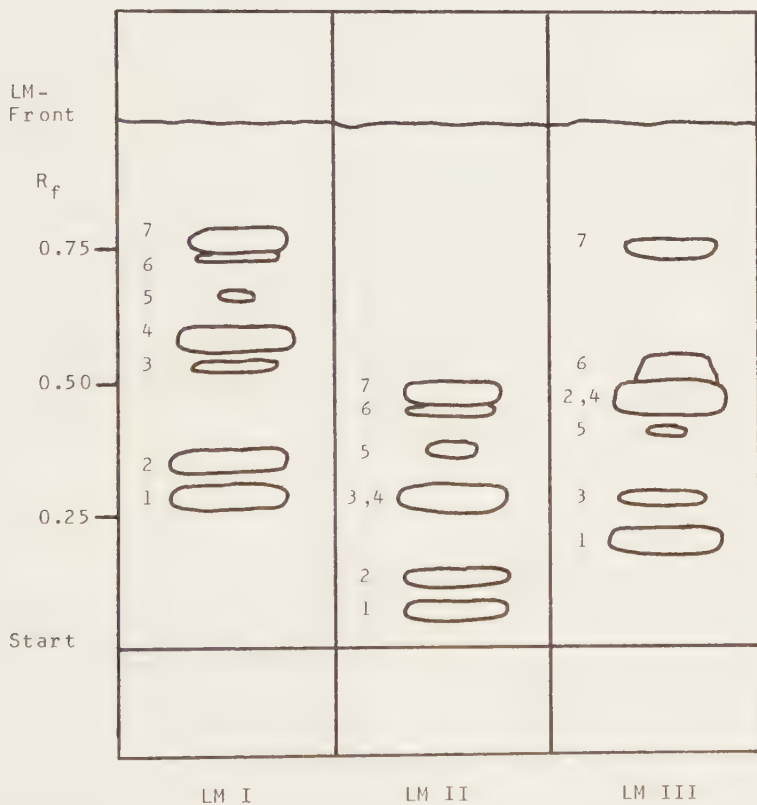
2.6. Auftrennversuche von Flavon G

2.6.1. Dünnschichtchromatographie

Da eine orientierende NMR-Spektroskopie auf Grund zahlreicher sich überlagernder Signale darauf schließen ließ, daß Flavon G noch ein Gemisch darstellte, versuchten wir, eine Optimierung der DC-Trennbedingungen durch Abwandlung des Laufmittels zu erreichen.

Wir modifizierten zunächst das LM I, indem wir in diesem CHCl_3 durch Toluol ersetzten (= LM II). Wie der DC-Vergleich in Abb. 6 zeigt, war durch die Fließmittel-Abänderung außer einer Verlagerung der Zonen in einen niedrigeren R_f -Bereich keine Trennverbesserung erreicht worden.

Abb. 6: DC-Skizze des MeOH-Rohextrakts in LM I, II und III



Detektion:

- a) UV 254
- b) Naturstoff-PÄG, UV 360

Zuordnung:

- 1 = Flavon G
- 2 = Silymonin
- 3 = unbekannt
- 4 = Silandrin
- 5 = unbekannt
- 6 = unbekannt
- 7 = 5,7-Dihydroxychromon

Verwendet man das für die präparative DC entwickelte säurefreie System $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ 14 : 6 : 4 (= LM III), so erhält man eine etwas bessere Auftrennung. Im DC-Bild war jetzt Zone Nr. 3 scharf abgegrenzt unmittelbar über Flavon G sichtbar. Für die Trennung von Silandrin und Silymonin war dieses Laufmittel jedoch nicht geeignet. Beide zeigten in diesem gleiche Laufhöhe.

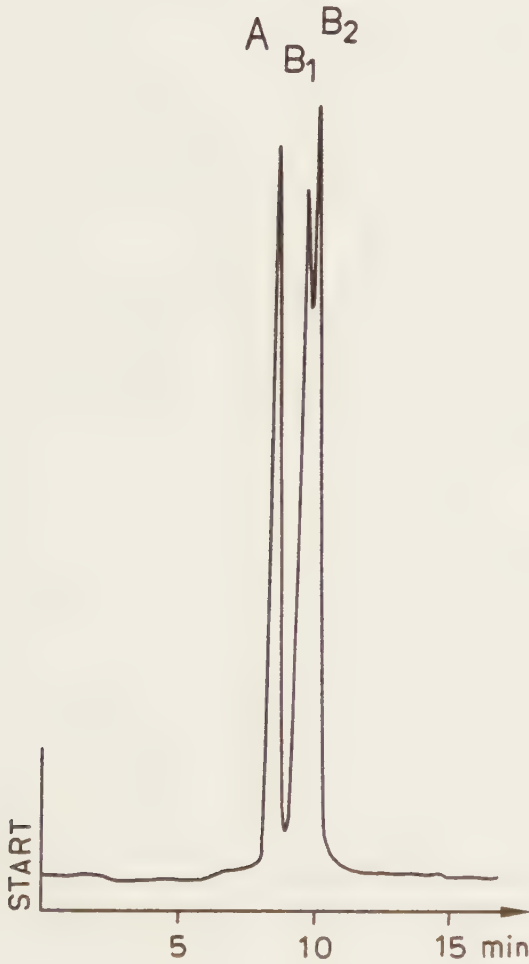
Die Detektion der Platten erfolgte in allen Fällen zunächst im UV 254, wobei jede Bande eine mehr oder weniger starke Fluoreszenzminderung ergab, sowie anschließend nach Behandlung mit Naturstoffreagenz im UV 360. Darauffolgendes Besprühen mit PÄG-Lösung bewirkte bei den meisten Zonen eine Steigerung der Farbtintensität. Während alle Zonen außer Nr. 3 eine typische Gelb- und Grüntönung ergaben, färbte sich Zone Nr. 3 nach dem Besprühen im Laufe mehrerer Stunden tiefviolett an. Im UV 360 entstand eine kräftige Rotfluoreszenz.

2.6.2. HPLC-Hochleistungsflüssigchromatographie

Da Flavon G auf der DC in allen drei Fließmitteln homogen erschien, unternahmen wir einen weiteren Trennversuch durch Einsatz der HPLC. Ausgehend von der bereits von TITTEL (21) vorgeschlagenen Methode benutzten wir eine mit "reversed-phase"-Material gepackte Säule und wandelten das bisher für die Silymarintrennung benutzte Fließmittel zum neuen System $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 1 : 1 + 5 % HCOOH ab. Die Zugabe der Säure erfolgte aus dem gleichen Grund, wie für die DC-Analyse beschrieben.

Detektiert wurde mit einem Spektralphotometer im UV-Maximum von Flavon G bei 285 nm. Für 10 µl injizierte 0.02 %ige Flavon-G-Lösung aus Fraktion I wurde folgendes Chromatogrammbild erhalten (Abb. 7):

Abb. 7: HPLC-Chromatogramm von Flavon G



Geräte- und Trennparameter: siehe Exp. Teil 3.3.1. b)

Wie aus dem Chromatogramm ersichtlich, stellte das isolierte "Flavon G" ein Gemisch aus mindestens drei Komponenten dar. Die in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten als A, B₁ und B₂ bezeichneten Peaks hatten etwa gleiche Flächengröße. Daraus konnte unter Annahme ähnlicher ϵ -Werte auf eine äquimolare Konzentration der drei Verbindungen geschlossen werden. Während die relative Retention der beiden Komponenten A und B₁ mit $\alpha = 1.26$ noch zu einer Grundlinientrennung führte, war die Retention für B₁ und B₂ mit $\alpha = 1.07$ so gering, daß nur eine teilweise Antrennung erreichbar war. Ein Vergleich der Flavon-G-Chargen aus den Fraktionen I und II (siehe S. 13) bewies, daß die Flavon-G-Gemische trotz unterschiedlicher Herkunft die gleiche Zusammensetzung aufwiesen und somit hierin identisch waren. Daher wurden die bisher als Fraktion I und Fraktion II getrennt behandelten Chargen vereinigt.

2.7. Präparative HPLC

2.7.1. HPLC-Fraktionierung

Aus der analytischen HPLC-Untersuchung von Flavon G war ersichtlich, daß eine Isolierung aller drei Komponenten durch präparative HPLC kaum erreichbar war. Der Verzicht auf ein säurehaltiges Laufmittel war aus bereits beschriebenen Gründen unumgänglich, was die Auflösung der Peaks weiter verschlechterte. Deshalb wurde versucht, durch Variation des Fließmittels den Abstand zwischen Peak A und Peak B₁ zu vergrößern.

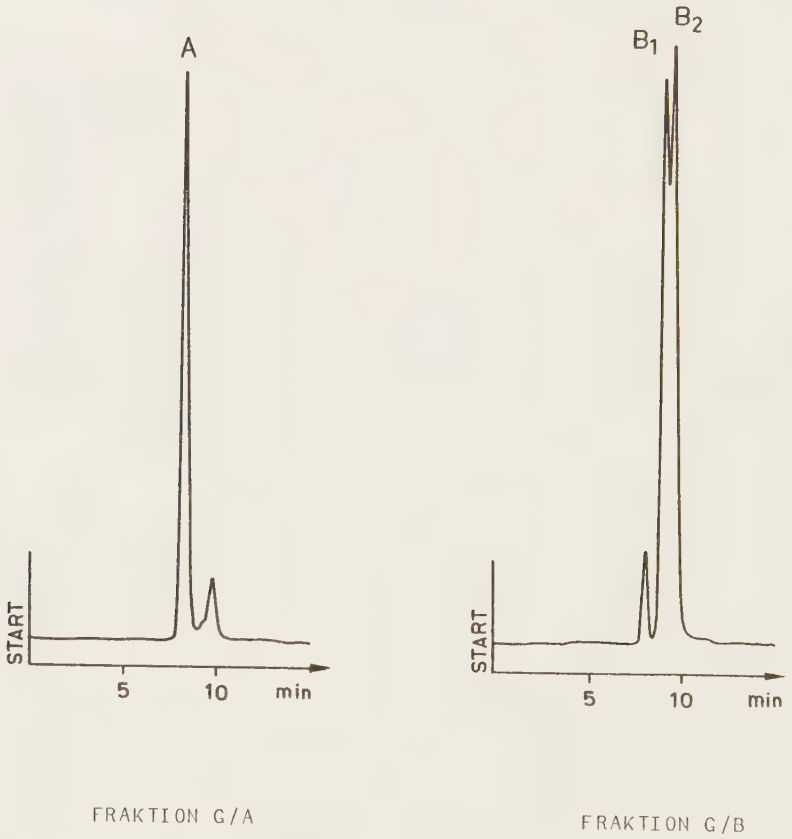
Die Auftrennung von Flavon G in Fraktion G/A und Fraktion G/B erfolgte auf "reversed-phase"-Material mit dem Laufmittel MeOH-H₂O 47 : 53. Aus Gründen der größeren Belastbarkeit wurde eine semipräparative Trennsäule von 30 cm Länge gewählt.

Auf diese Weise konnten in 110 Durchgängen insgesamt 330 mg Flavon G aufgetrennt werden. Pro Injektion ließen sich unter den gewählten Bedingungen 3 mg Flavon G in einem Zeitraum von 40 min chromatographieren.

Da es infolge starker Säulenüberladung zu einer Überlappung im Grundlinienbereich zwischen Peak A und dem Doppelpeak B kam, mußte auf diese Mischfraktion zur Substanzgewinnung verzichtet werden. Es wurden 60 mg Fraktion G/A und 150 mg Fraktion G/B gewonnen. Beide waren von einem geringen Teil der anderen Komponente begleitet. Die Verunreinigung betrug bei Fraktion G/A 20 %, bei Fraktion G/B 11 %.

Durch noch engeres Schneiden der Fraktionen konnten wenige Milligramm an G/A und G/B erhalten werden, deren Verunreinigung <5 % lag. Allerdings war der Substanzverlust dabei so groß, daß eine Isolierung in größerem Maßstab nicht möglich war.

Abb. 8: HPLC-Profil der isolierten Fraktionen G/A und G/B



Geräte- und Trennparameter: siehe Exp. Teil 3.3.1. b)

2.7.2. Versuche zur Strukturaufklärung von Fraktion G/A und G/B

Eine erneute Chromatographie der beiden isolierten Fraktionen zusammen mit Flavon G auf HPTLC-Platten zeigte, daß in den Fließmitteln II und III zwischen den Fraktionen G/A und G/B nur ein äußerst geringer R_f -Unterschied bestand. Dieser reichte für eine präparative Trennung auch über HPTLC-Platten nicht aus.

In den UV- und IR-Spektren stimmten beide mit denen von Flavon G völlig überein. Auch nach Zusatz von Verschiebungsreagenzien waren die erhaltenen UV-Spektren gleich. Das gleiche galt für die Massenspektren beider HPLC-Fraktionen.

Auch die $^1\text{H-NMR}$ -Spektren brachten keine zusätzlichen Informationen, da nur die immer noch relativ stark verunreinigten Fraktionen von G/A und G/B verwendet werden konnten. Vor allem das Spektrum von Fraktion G/B zeigte in weiten Bereichen schwer interpretierbare Signalgruppen, die auf ein Gemisch deuteten.

Dieses Verhalten, besonders aber das Auftreten eines Doppelpeaks in der analytischen HPLC, ließen Ähnlichkeiten mit dem bereits seit längerer Zeit bekannten Silybin erkennen (21, 100).

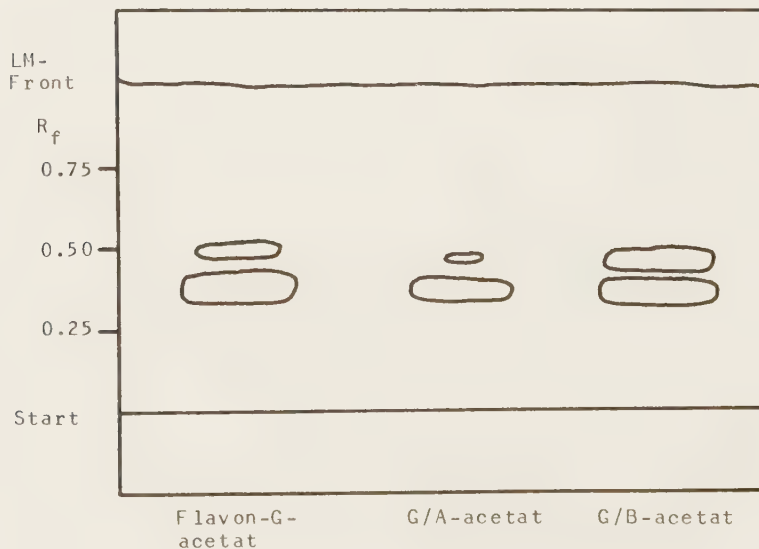
Neuere röntgenstrukturanalytische Untersuchungen von LOTTER hatten gezeigt, daß das Silybin als Diastereomerenpaar im Komponentenverhältnis 1 : 1 vorliegt (22). Dies erklärt das Auftreten eines Doppelpeaks im HPLC-Chromatogramm des Silybins. Eine exakte Zuordnung beider Silybin-Isomere zu den jeweiligen Peaks im Chromatogramm war bisher nicht möglich.

Da nach dem Massenspektrum mindestens zwei Komponenten des Gemisches das gleiche Molekulargewicht von 466 besaßen, sollte es sich bei Flavon G um ein Gemisch aus drei isomeren Flavonolignan handeln.

2.8. Acetylierung

Da sehr häufig Substanzgemische über ihre Derivate trennbar sind, acetylierten wir probeweise je 5 mg von Flavon G sowie der HPLC-Fractionen G/A und G/B bei Raumtemperatur in Pyridin/Acetanhydrid 1 : 1. Die erhaltenen Acetate wurden dünnenschichtchromatographisch verglichen. Als Laufmittel diente die Mischung CH_2Cl_2 -Aceton 100 : 4, die sich bereits andersweitig zur Isomerentrennung bewährt hatte (23) (= LM IV). Die Detektion erfolgte im UV 254. Der negative Ausfall der FeCl_3 -Reaktion zeigte, daß keine phenolischen OH-Gruppen mehr vorhanden waren.

Abb. 9: DC-Skizze der Acetate von Flavon G, Fraktion G/A und Fraktion G/B



LM: CH_2Cl_2 -Aceton
100 : 4

Detektion: UV 254

Wie aus der DC-Skizze (Abb. 9) ersichtlich ist, trennte sich das Flavon-G-acetat in zwei Zonen auf, wobei die Zone mit dem niedrigeren R_f -Wert eine deutlich höhere Intensität aufwies als die obere Bande.

G/A-acetat war im Chromatogramm als einzelne Zone sichtbar. Ihr R_f -Wert stimmte exakt mit dem der unteren Zone von Flavon-G-acetat überein.

G/B-acetat erwies sich wieder wie Flavon-G-acetat als Gemisch, nur mit unterschiedlichem Konzentrationsverhältnis.

Daraus ergibt sich:

- a) G/B-acetat besteht aus mindestens zwei Substanzen. Dieser Befund deckt sich mit dem Auftreten eines Doppelpeaks im HPLC-Chromatogramm von Fraktion G/B.
- b) Da G/A-acetat denselben R_f -Wert wie eine Komponente von G/B-acetat besitzt, ist eine Auftrennung des Flavon-G-Dreikomponentengemisches über DC nicht möglich.
- c) Eine Auftrennung und Isolierung der drei Acetate, die offensichtlich den drei Peaks im HPLC-Chromatogramm von Flavon G entsprechen, ist durch präparative DC der acetylierten HPLC-Fractionen G/A und G/B möglich.

2.9. Isolierung der drei Komponenten von Flavon G

2.9.1. Isolierung von Flavon-A-acetat

50 mg der HPLC-Fraktion G/A wurden wie beschrieben bei Raumtemperatur mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert und aufgearbeitet. Auf diese Weise erhielten wir 51 mg Rohacetat. Durch präparative DC in LM IV gelang es, dieses von Resten an G/B-acetat und Nebenprodukten der Acetylierung zu reinigen.

Nach diesem Schritt standen uns 15 mg Flavon-A-acetat von hoher Reinheit zur Verfügung.

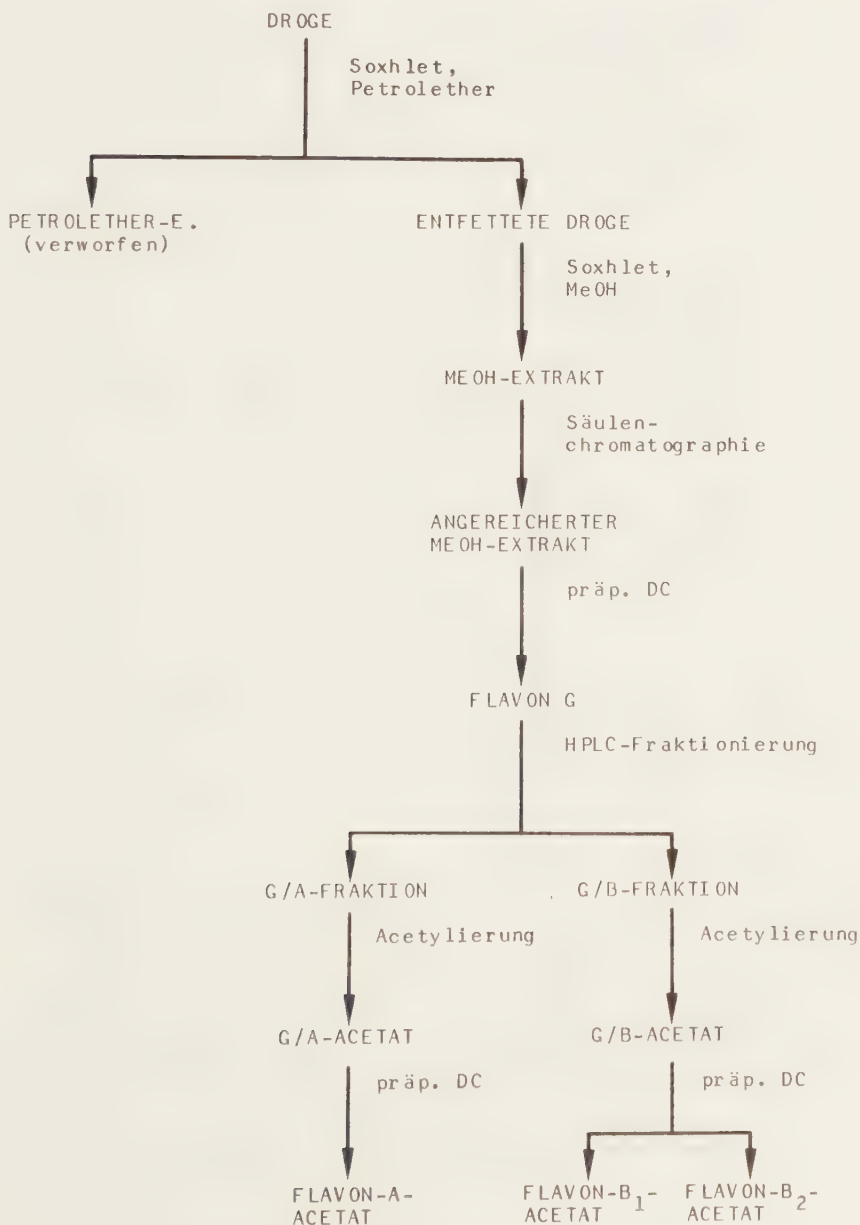
2.9.2. Isolierung von Flavon-B₁-acetat und Flavon-B₂-acetat

Im Unterschied zur G/A-Fraktion wurde diesmal die Zeitdauer der Acetylierung von 24 auf 70 Stunden verlängert.

130 mg G/B-Fraktion ergaben 150 mg Rohacetat, das durch präparative DC in Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat aufgetrennt wurde. Die Ausbeuten an Reinacetaten betrugen 37 mg bzw. 21 mg. Sie entsprachen im HPLC-Chromatogramm von Flavon G den Peaks B₁ und B₂.

Eine definitive Zuordnung eines dieser Peaks zu Flavon-B₁- oder Flavon-B₂-acetat war zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu treffen.

Schema: Extraktions- und Isolierungsgang



3. Zuordnung von Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat

Bei der HPLC-Analyse eines Teils der G/B-Fraktion, der für die NMR-Messung mit Trifluoressigsäure versetzt worden war, war ein auffälliger Unterschied im Chromatogramm zu der ursprünglichen Fraktion G/B aufgetreten (Abb. 10).

Abb. 10: HPLC-Chromatogramme von Fraktion G/B vor und nach der Säurebehandlung

vor Säurezugabe



nach Säurezugabe



Geräte- und Trennparameter: siehe Exp. Teil 3.3.1. b)

In dem HPLC-Profil hatte Peak B_1 stark an Intensität verloren und war nur noch als schwache Schulter im Hauptpeak B_2 erkennbar (siehe Abb. 10). Während in der ursprünglichen Fraktion G/B die Komponenten B_1 und B_2 im Verhältnis 1 : 1 vorlagen und nur eine geringe Verunreinigung durch Peak A zu beobachten war, betrug nach der Säurebehandlung das Verhältnis von B_1 zu B_2 etwa 1 : 6. Die Verunreinigung durch Peak A trat hier stärker in Erscheinung.

Dieses Verhalten sprach für einen strukturellen Zusammenhang. Zudem sollte es durch einen DC-Vergleich der Acetate dieser G/B-Fraktion mit den Acetaten der ursprünglichen möglich sein, anhand der veränderten Intensitäten eine Zuordnung der HPLC-Peaks A, B_1 und B_2 zu den Zonen auf der DC zu treffen.

Zu diesem Zweck acetylierten wir zunächst die mit Säure behandelte G/B-Fraktion. Die beiden auf der DC in LM IV auftretenden Zonen lagen in einem Intensitätsverhältnis von etwa 2 : 1 (obere Zone : untere Zone) vor.

Aus dem DC-Vergleich ergibt sich entweder,

- daß der acetylierte B_1 -Peak aus der HPLC auf der DC der oberen Zone des G/B-Acetatgemisches entspricht. In diesem Fall müßte die Intensitätsverteilung des säurebehandelten G/B-acetats auf der DC etwa 1 : 9 (obere Zone : untere Zone) erscheinen.
- daß es sich beim acetylierten B_1 -Peak aus der HPLC um die untere Zone von G/B-acetat handelt. In jenem Fall ist eine Intensitätsverteilung von etwa 2 : 1 (obere Zone : untere Zone) zu erwarten, was dem DC-Bild entsprach.

Damit war eindeutig bewiesen, daß die untere Zone auf der DC von G/B-acetat vom acetylierten B_1 -Peak stammt.

Für die weiteren Untersuchungen und zur Strukturaufklärung standen 15 mg Flavon-A-acetat, 37 mg Flavon- B_1 -acetat und 21 mg Flavon- B_2 -acetat zur Verfügung.

4. Strukturaufklärung

4.1. Flavon-A-acetat

Die bisherigen Untersuchungen von Fraktion G/A hatten bereits ergeben, daß genuin ein 5,7-dihydroxy-substituiertes Flavonolignan mit einem Molekulargewicht von 466 vorlag.

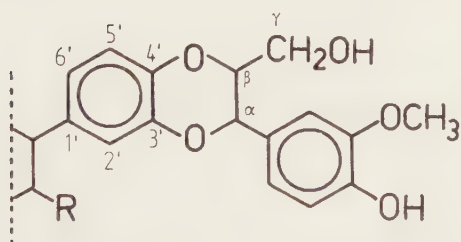
Nach einem Vergleich des ^1H -NMR-Spektrums von Flavon-A-acetat mit denen von Silybin-, Silychristin- und Silydianin-acetat war eine 1,4-Benzodioxan-Verknüpfung oder jene, wie sie im Silydianin vorliegt, auszuschließen. Es fehlten die für die C- α /C- β -Protonen typischen Signalgruppen bei 4.88/4.25 ppm und 3.4/2.9 ppm.

Die bei 3.9, 4.37 und 5.66 ppm auftretenden Signale sprachen für eine Dihydrobenzofuran-Struktur.

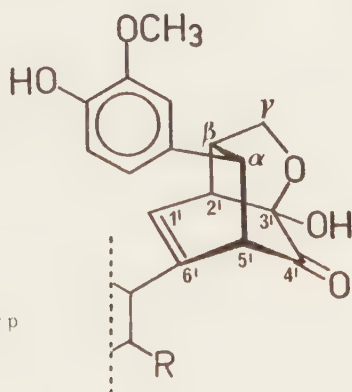
In den bisher bekannten Flavonolignanen (5, 10, 24 - 26) sind drei unterschiedliche Verknüpfungsweisen des Coniferylalkohols mit dem Flavonoidteil realisiert (Abb. 11). Während in Verbindungen vom Silybin-Typ diese unter Ausbildung einer Benzodioxan-Struktur zustande kommt, erfolgt sie beim Silydianin-Typ über eine Hemiacetal-Struktur mit einem zusätzlichen Ringsystem. Eine dritte Möglichkeit, ein Dihydrobenzofuran-Gerüst, ist im Silychristin-Typ realisiert.

Diese unterschiedlichen Verknüpfungsweisen ergeben für die vier Protonen des aliphatischen Coniferylanteils (H- α , β , γ_1 , γ_2) Signale in definierten Bereichen des NMR-Spektrums und erlauben die eindeutige Zuordnung zum entsprechenden Verknüpfungstyp.

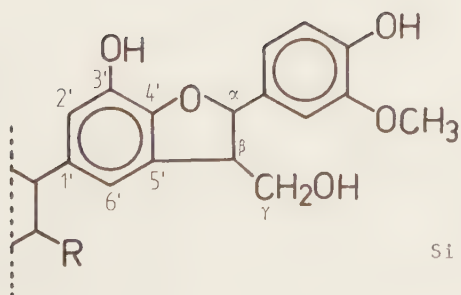
Abb. 11: Verknüpfungsarten zwischen Coniferyl- und Flavonoidteil bei den Flavonolignan



Silybin-Typ



Silydianin-Typ

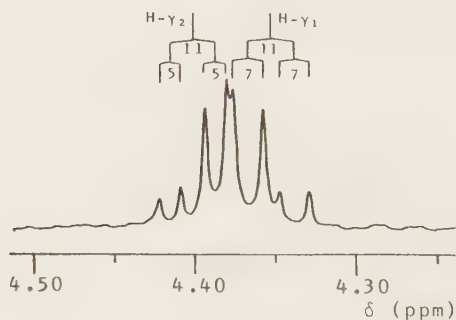


Silychristin-Typ

Die drei Signalgruppen für die H- α , H- β und H- γ -Protonen waren somit leicht dem Silychristin-Typ zuzuordnen. Während im 200-MHz-Spektrum von Flavon-A-acetat die H- γ -Protonen ähnlich wie bei Silychristin als breites Dublett mit einer Kopplungskonstanten von 5 Hz erschienen, zeigte eine Aufnahme bei höherer Feldstärke, daß beide H- γ -Protonen von Flavon-A-acetat magnetisch nicht äquivalent waren. Neben einer geminalen Kopplungskonstanten von 11 Hz waren zwei weitere Kopplungen mit $J = 5$ Hz und $J = 7$ Hz nachzuweisen. Die Protonen des Dihydrobenzofuranteils ergaben ein ABMX-System, das allgemein durch komplexe Kopplungsmuster gekennzeichnet ist.

Das Proton H- β stellte den M-Teil dieses Spinsystems dar und erschien als Multiplett mit Zentrum bei 3.9 ppm. Das H- α bei 5.66 ppm koppelte mit 3.5 Hz und unterschied sich darin deutlich von dem entsprechenden Proton im Silychristin ($J_{\alpha\beta} = 6$ Hz).

Abb. 12: Flavon-A-acetat, Ausschnitt H- γ_1, γ_2 im ^1H -NMR-Spektrum bei 400 MHz



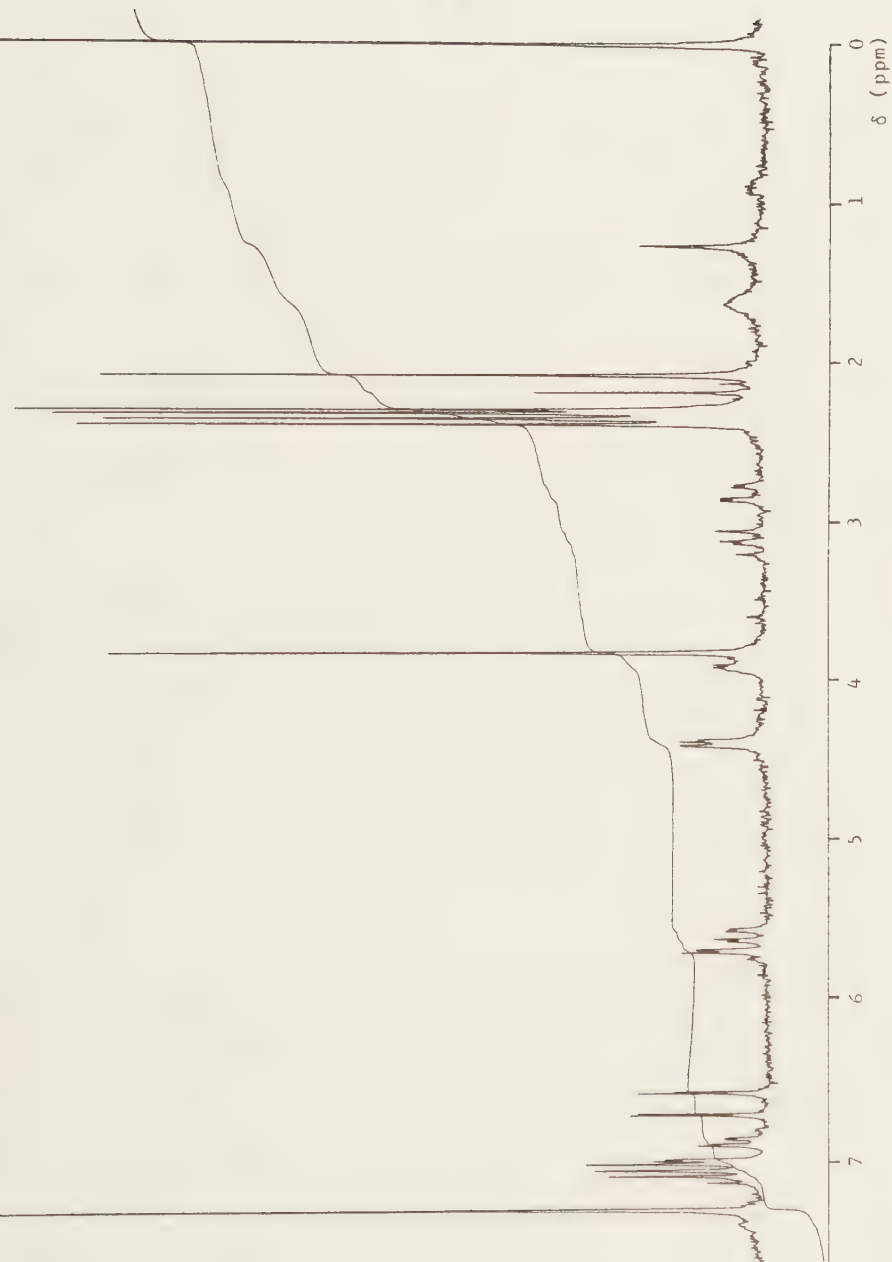


Abb. 13: ^1H -NMR-Spektrum von Flavon-A-acetat (200 MHz, CDCl_3)

Auffällig waren im Spektrum von Flavon-A-acetat zwischen 2.06 und 2.37 ppm fünf scharfe Singulett, die der Integration nach von je drei Protonen herrührten und ihrer Lage nach von Acetylgruppen stammen sollten (16).

Daß ein Flavanon vorliegen mußte, bestätigte das Auftreten eines für diese Substanzklasse typischen ABX-Systems. Der X-Teil, der von dem Proton am C-2 repräsentiert wurde, erschien bei 5.56 ppm als Dublett-Dublett mit $J_{AX} = 3$ Hz und $J_{BX} = 13$ Hz. Der A- und B-Teil dieses Spinsystems mit den entsprechenden Kopplungskonstanten wurde bei 2.80 ppm und 3.11 ppm registriert und stammte von den beiden C-3-ständigen Protonen, die wegen der Faltung des heterocyclischen Sechsrings äquatorial und axial angeordnet waren. Aus den verschiedenen Diederwinkeln zwischen H-2 einerseits und dem axialen oder äquatorialen Proton am C-3 andererseits resultierten die stark unterschiedlichen Kopplungskonstanten für AX und BX, wobei die größere Konstante von $J = 13$ Hz den trans-diaxialen Protonen am C-2 und C-3 zuzuordnen waren. In beiden Signalgruppen zeigte sich die erwartete geminale Kopplung zwischen A und B. Mit $J = 17$ Hz lag sie in einer Größenordnung, wie sie für Flavanone allgemein beschrieben wird (27). Sowohl die Verschiebungswerte als auch die Kopplungskonstanten unterschieden sich von denen, die für Silandrin und Silymonin gefunden worden waren (5), nur unwesentlich.

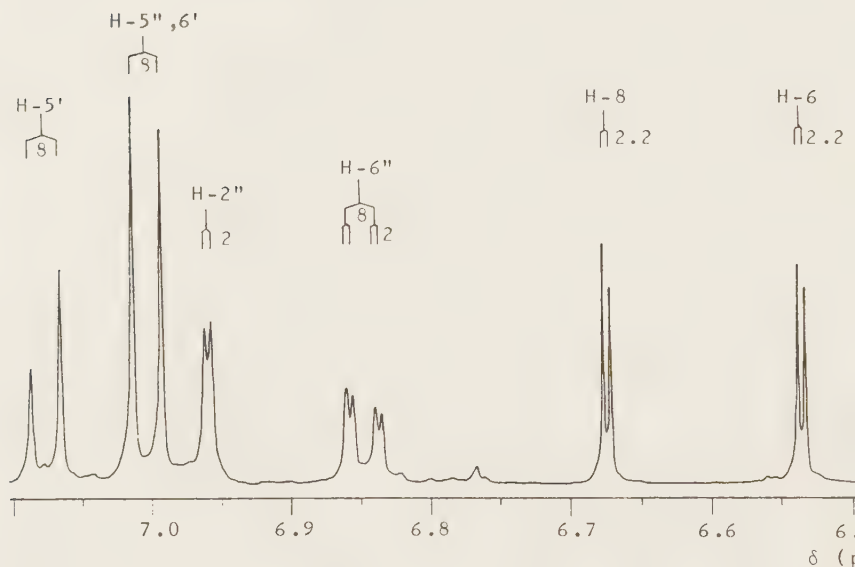
Durch Doppelresonanz-Einstrahlung im AB-Teil wurde das Signal von H-2 zu einem breiten Singulett entkoppelt. Strahlte man dagegen im X-Teil ein, so vereinfachte sich der AB-Teil zu zwei Dubletts, die nur noch die geminale Kopplung mit $J = 17$ Hz aufwiesen.

Das scharfe Singulett, das bei 3.80 ppm registriert wurde, integrierte für drei Protonen und lag im typischen Bereich aromatischer Methoxygruppen (28).

Die in aromatischen Bereich auftretenden Signale zwischen 6.5 ppm und 7.1 ppm wurden der Integration nach von sieben Protonen hervorgerufen. Die beiden Dubletts bei 6.54 ppm und 6.68 ppm, die jeweils eine meta-Kopplung von 2.2 Hz zeigten, konnten auf Grund ihrer typischen Lage und Kopplung eindeutig als H-6 und H-8 bestimmt werden und bestätigten damit eine 5,7-Substitution im A-Ring (16).

Die übrigen von Aromaten stammenden Signale im Spektrum ließen sich mit Hilfe der für Silychristin bekannten Daten (10) gut interpretieren. So erschien bei 6.84 ppm das zum Coniferylteil gehörende H-6" als Dublett-Dublett mit einer Kopplungskonstanten $J_1 = 2$ Hz und $J_2 = 8$ Hz, die auf eine meta- und eine ortho-Kopplung zurückzuführen waren. Als benachbarter Kopplungspartner trat H-5" unter Ausbildung eines Dubletts bei 7.00 ppm in Resonanz. Das meta-koppelnde Proton H-2" wurde bei 6.95 ppm registriert. Eine definitive Zuordnung dieser Protonen im Spektrum war jedoch erst nach einer weiteren Messung mit einem Gerät höherer Feldstärke (400 MHz) möglich (Abb. 14, S. 34).

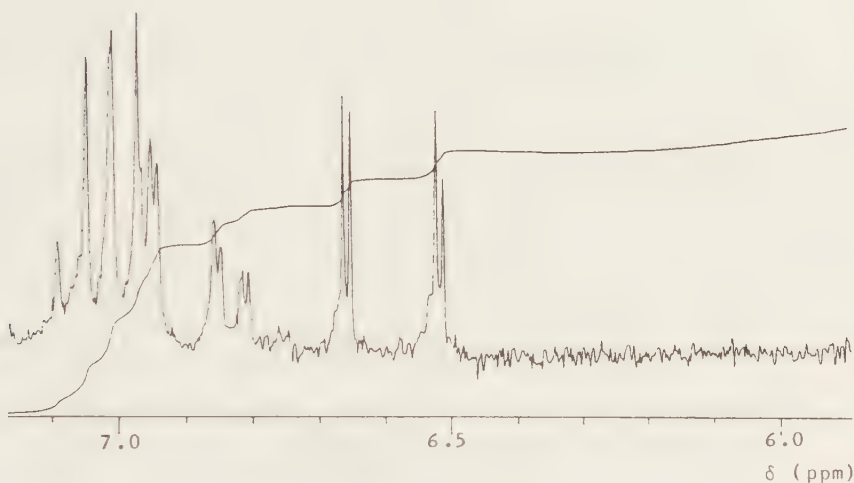
Abb. 14: Flavon-A-acetat, Ausschnitt Aromaten im ^1H -NMR-Spektrum bei 400 MHz



Neben der nun eindeutigen Zuordnung von $\text{H}-5''$ mit $J = 8 \text{ Hz}$ zum Dublett bei 7.00 ppm erschien in tieferem Feld bei 7.08 ppm ein weiteres Dublett mit $J = 8 \text{ Hz}$, das für ein Proton integrierte und auf eine ortho-Kopplung deutete. Als Kopplungspartner kam nur ein zweites Dublett in Frage, das auf Grund zufälliger Isochronie mit dem Dublett von $\text{H}-5''$ zusammenfiel. Die Integration bestätigte, daß dieses Signal bei 7.00 ppm von zwei Protonen stammen mußte.

Beim Betrachten des hochaufgelösten 200-MHz-Spektrums von Flavon-A-acetat ließ sich erkennen, daß jenes Dublett keine homogenen Resonanzlinien besaß, sondern an zwei Stellen Verbreiterungen aufwies, die von einem zweiten Proton stammen konnten (Abb. 15).

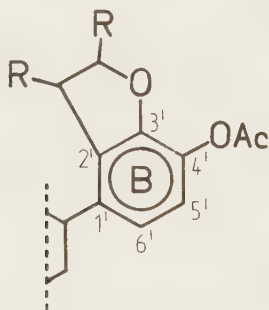
Abb. 15: Flavon-A-acetat, Ausschnitt Aromaten im ^1H -NMR-Spektrum (200 MHz)



Um diesen Befund zu verifizieren, versuchten wir, durch Doppelresonanz eine endgültige Klärung zu erreichen. Nach Einstrahlen bei H-6" vereinfachte sich das Dublett von H-2" zum Singulett und das zu H-5" gehörige Dublett mit einer ursprünglichen Kopplung von 8 Hz zu einem Dublett mit der Restkopplung von 2 Hz. Eine gänzliche Degenerierung zum Singulett erfolgte nicht, da wegen der geringen Frequenzdifferenz keine vollständige Entkopplung zustande kam. Neben diesen Signalen blieben die beiden Dubletts bei 7.00 ppm und 7.08 ppm in ihrer chemischen Verschiebung und Kopplung unverändert.

Da auf Grund der bisherigen Ergebnisse im B-Ring zwei Protonen mit einer ortho-Kopplung existieren mußten, war ein Substitutionstyp für den B-Ring, wie er in Silychristin vorliegt, auszuschließen. Es blieb deshalb bei 3',4'-Substitution des Flavanon-Grundkörpers nur eine Möglichkeit für die Verknüpfungsweise, d.h. die C-O-Verknüpfung am C-3' und die C-C-Bindung am C-2' (Abb. 16).

Abb. 16: Substitutionsmuster des B-Rings von Flavon-A-acetat



Damit stellt Flavon-A-acetat die acetylierte Form eines neuen Flavonolignans vom Dihydrobenzofuran-Typ dar, in dem die Verknüpfung zwischen einem Flavonoid-Grundkörper und dem Coniferylalkohol auf eine Weise stattgefunden hat, wie sie KALOGA für ein von ihm aus der violetteblühenden *Silybum-marianum*-Droge isoliertes Isosilychristin beschrieben hat (1

Während bei dieser Verbindung das 3-Hydroxyflavanon Taxifolin als biosynthetische Vorstufe fungiert, ist dem Flavon-A-acetat die 3-Desoxyflavanon-Struktur des Eriodictyols zu Grunde zu legen.

Die unterschiedliche Verknüpfungsweise im Vergleich zum Silychristin verändert das IR-Spektrum von Flavon-A-acetat im Gebiet der aromatischen Valenzschwingungen um 1500 cm^{-1} und im "fingerprint"-Bereich.

Während die Bande bei 1510 cm^{-1} in den Spektren von Silychristin- und Flavon-A-acetat auftritt, deutet die nur bei Silychristin-acetat auftretende Bande bei 1490 cm^{-1} auf Unterschiede im aromatischen Bereich. Ein schwaches Signal bei 825 cm^{-1} , das im Spektrum von Silychristin-acetat nicht zu beobachten ist, könnte für die 2',3',4'-Substitution im B-Ring charakteristisch sein (28)(Abb. 20, S. 44).

Das Massenspektrum von Flavon-A-acetat bestätigte die ermittelte Struktur. Neben dem Molekülpeak bei $m/e\ 676$ läßt sich das typische Fragmentierungsmuster acetylierter Flavonoide beobachten (44), das durch sukzessive Abspaltung von Keten gekennzeichnet ist, was sich in einem fortlaufenden Verlust von 42 Masseneinheiten ausdrückt. Das als M-18 registrierte Signal mit $m/e\ 658$ war insofern auffallend, als es den Verlust eines Wassermoleküls zu Beginn der Fragmentierung anzeigte. Eine Abspaltung von H_2O aus acetylierten Flavonoiden ist nicht außergewöhnlich, solange sie nach der Abspaltung mindestens einer Acetylgruppe erfolgt. Da jedoch in diesem Falle die für eine Wasserabspaltung notwendigen OH-Gruppen acetyliert vorlagen, mußte dieser Massenverlust auf andere Weise stattgefunden haben.

Eine mögliche Erklärung liefert die Annahme einer Ringöffnung in einem der beiden Heterocyclen, die zur Entstehung einer freien OH-Gruppe und nachfolgender Eliminierung von H_2O führen könnte. Ein Beispiel für eine derartige Aufspaltung eines Dihydrobenzofuran-Gerüsts zeigt die Fragmentierung des Lignans Herpetotriol, die von FAVRE-BONVIN beschrieben wurde (29).

Ebenso denkbar ist eine Isomerisierung zum Chalkon durch Ringöffnung im Chromanonteil während der Messung und anschließende Wasserabspaltung. Auch für ein derartiges Verhalten existieren Beispiele (30).

Demnach handelt es sich bei Flavon-A-acetat um eine neue Verbindung, die mit Silandrin und Silymonin isomer ist und der die Struktur eines 3-Desoxy-Isosilychristin-pentaacetats⁺ zukommt (Abb. 27, S. 52).

Der chemische Nomenklaturvorschlag wäre:

2-[2,3-Dihydro-2-(3-methoxy-4-acetyl-phenyl)-3-acetyl-methyl-7-acetyl-benzofuranyl-4]-5,7-diacetyl-chromanon-4.

⁺) Die Bezeichnung "Isosilychristin" wird hier zur Benennung eines Regioisomers von Silychristin verwendet (siehe auch (18) der Lit.). Die Isomerie bezieht sich auf die C-O- und C-C-Verknüpfung im B-Ring.

Im Gegensatz dazu bezeichnet der Name "Isosilybin" das Regioisomer des Silybins bezüglich der Substituenten an C- α und C- β (siehe auch Abb. 28, S. 55).

4.2. Flavon-B₁-acetat

Das 200-MHz-Spektrum sprach auch hier für das Vorliegen eines Flavonolignans mit Dihydrobenzofuran-Struktur. Während der X-Teil des ABMX-Systems bei 5.60 ppm registriert wurde, erschien bei 4.4 ppm ein Multiplett, das auf Grund seiner Verschiebung und Integration den beiden γ -Protonen zuzuordnen war und den AB-Teil dieses Spinsystems darstellte. H- β trat bei 3.8 ppm in Resonanz und wurde von einem Singulett überlagert, das von einer aromatischen Methoxygruppe stammte.

Die Flavanonstruktur von Flavon-B₁-acetat drückte sich wieder durch das typische ABX-System der Protonen an C-2 und C-3 aus. Weder in der chemischen Verschiebung noch in den Kopplungskonstanten war ein wesentlicher Unterschied zum Spektrum des Flavon-A-acetats festzustellen.

Die fünf Singulett zwischen 2.09 ppm und 2.38 ppm, deren Integration 15 Protonen ergab, deuteten wieder auf fünf Acetylgruppen im Molekül hin.

Im Bereich der aromatischen Protonen von Flavon-B₁-acetat zeigte sich zunächst ein ähnliches Bild wie bei Flavon-A-acetat. Die beiden Signale bei 6.54 ppm und 6.79 ppm, die jeweils als Dublett mit einer Kopplung von 2.2 Hz auftraten, ließen sich wieder den Protonen am C-6 und C-8 zuordnen (16). Damit war das bekannte Phloroglucin-Substitutionsmuster für den A-Ring festgelegt. Das folgende, in tieferem Feld liegende Doppeldublett mit $J_1 = 1.6$ Hz und $J_2 = 8$ Hz mußte von einem aromatischen Proton stammen, das sowohl mit einem meta-ständigen als auch mit einem direkt benachbarten Proton in ortho-Stellung koppelte. Auch dieses Signal ließ sich durch Vergleich der J - und δ -Werte mit denen von Silychristin als das H-6" identifizieren. Die zugehörigen Dubletts mit $J = 1.6$ Hz und $J = 8$ Hz konnten in den Signalgruppen bei 7.04 ppm und 7.03 ppm lokalisiert werden, wengleich die schlechte Auflösung eine zusätzliche Untersuchung mit einem Gerät höherer Feldstärke nötig machte.

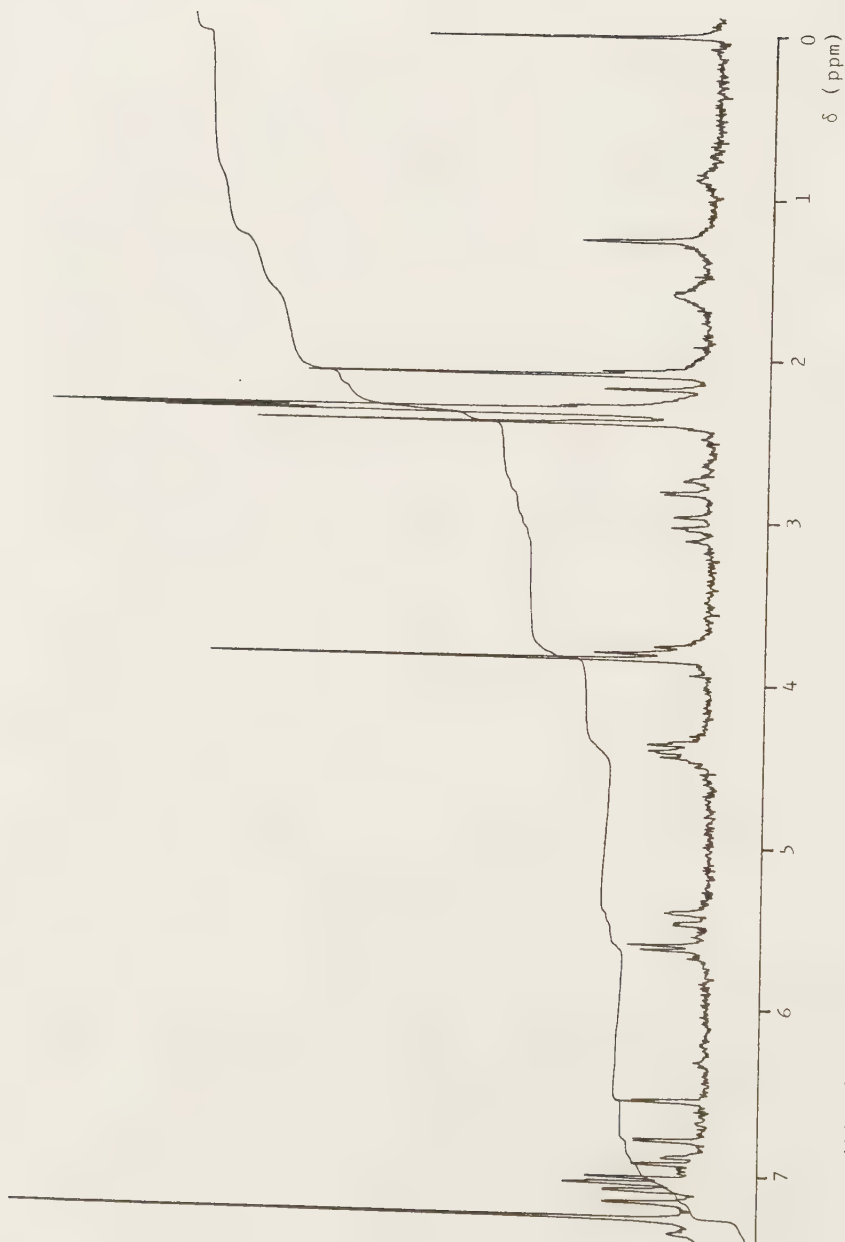
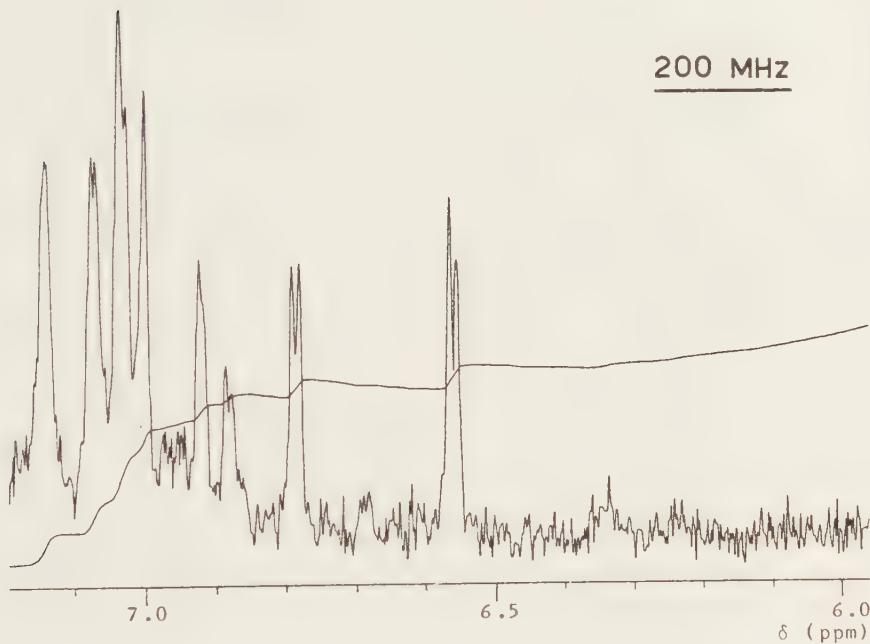


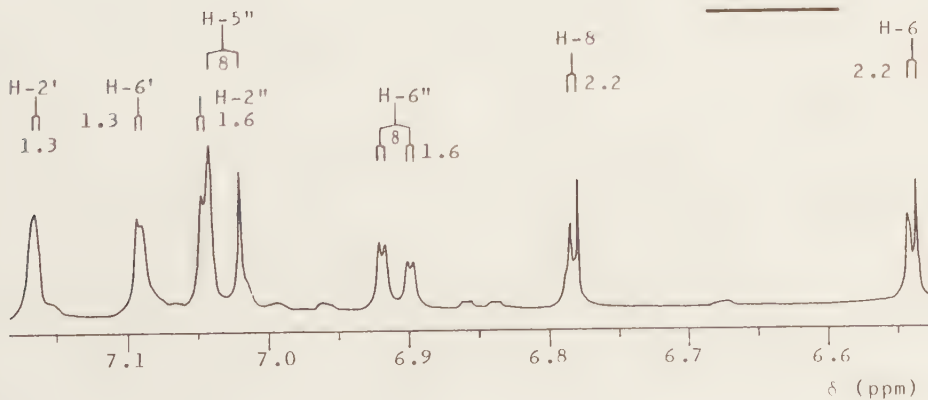
Abb. 17: ^1H -NMR-Spektrum von Flavon-B₁-acetat (200 MHz, CDCl_3 , TMS int.)

Abb. 18: Flavon-B₁-acetat, Ausschnitt der aromatischen Protonen im ¹H-NMR-Spektrum bei 200 MHz und 400 MHz

200 MHz



400 MHz

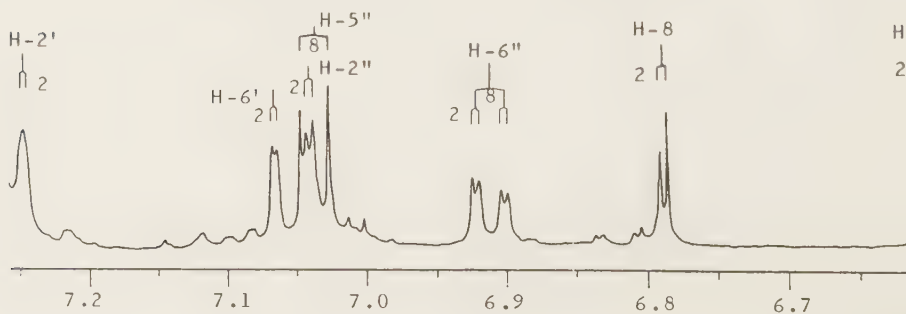


Bei einer Aufnahme mit höherer Feldstärke kann die Tatsache ausgenutzt werden, daß die Kopplungskonstanten unabhängig vom äußeren Magnetfeld H_0 sind. Stellen zwei in einem Spektrum auftretende Resonanzlinien ein Dublett dar, das von einem einzigen Kern stammt, so bleibt der Linienabstand (in Hz) gleich. Handelt es sich dagegen um zwei Singulets, so vergrößert sich der Linienabstand in dem Maße, in dem die Meßfrequenz erhöht wird (28). Erst hierdurch kann oft bei einer Signalgruppe zwischen einem Dublett oder zwei Singulets unterschieden werden. Zum anderen erlaubt diese Messung zumeist eine genauere Integration der Peaks.

Das 400-MHz-Spektrum mit einer Kopplungskonstanten von 8 Hz für das Dublett bei 7.03 ppm bestätigte die H-5"-Zuordnung. Ein zweites Dublett mit einer meta-Kopplung von 1.6 Hz wurde selbst unter diesen Aufnahmebedingungen nicht optimal aufgelöst und fiel zum Teil mit einer Resonanzlinie von H-5" zusammen.

Im noch weiter paramagnetisch verschobenen Teil des Aromatenspektrums waren zwei Signalgruppen zu erkennen, die als Dubletts jeweils mit einer Kopplungskonstanten von 1.3 Hz erschienen. Während diese Aufspaltung im hochaufgelösten 200-MHz-Spektrum deutlich sichtbar war, ließ sich das Kopplungsmuster im 400-MHz-Spektrum schlechter erkennen. Im Vergleich zu dem ebenfalls bei 400 MHz aufgenommenen Spektrum von Silychristin-hexaacetat konnten jedoch auch diese Resonanzlinien eindeutig zugeordnet werden.

Abb. 19: Silychristin-hexaacetat, Ausschnitt Aromaten im ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz)



Das Dublett bei 7.09 ppm mußte von H-6' und das bei 7.16 ppm von H-2' stammen. Damit lag eine dem Silychristin entsprechende B-Ring-Substitution vor.

Das IR-Spektrum des Flavon-B₁-acetats unterschied sich nur unbedeutend von dem des Silychristin-acetats. Die bei 1490 cm⁻¹ auftretende Bande in beiden Spektren bestätigte den analogen Aufbau des aromatischen Gerüsts und damit das Ergebnis der NMR-Untersuchung (Abb. 20, S. 44).

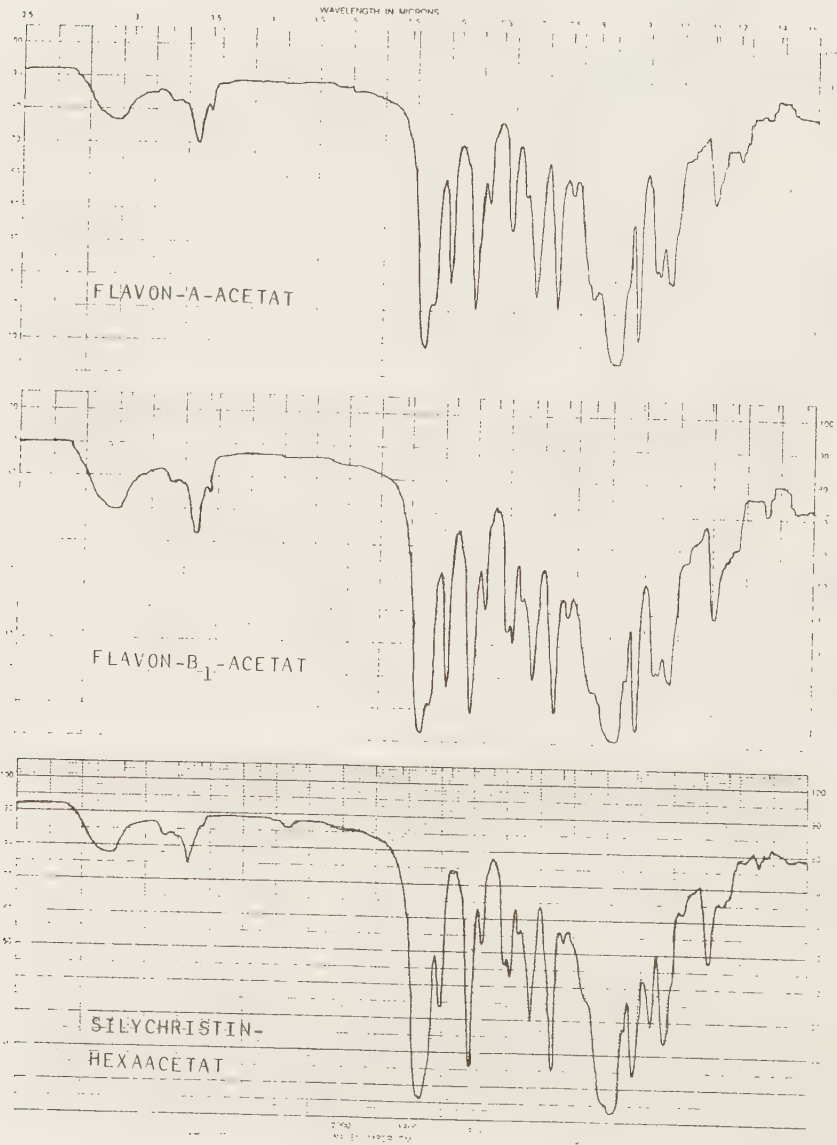
Das Massenspektrum von Flavon-B₁-acetat zeigte neben dem Molekülion bei m/e 676 dieselben Fragmentierungsschritte wie das Flavon-A-acetat. Mit m/e 658 trat wieder ein M-18-Signal auf, das sich durch Wasserabspaltung nach Ringöffnung im Molekül erklären läßt (siehe S. 37/38).

Bei Flavon-B₁-acetat handelt es sich demnach um das 3-Desoxy-Silychristin-pentaacetat (Abb. 27, S. 52).

Der chemische Nomenklaturvorschlag wäre:

2- [2,3-Dihydro-2-(3-methoxy-4-acetyl-phenyl)-3-acetyl-methyl-7-acetyl-benzofuranyl-5]-5,7-diacetyl-chromanon-4.

Abb. 20: IR-Spektren von Flavon-A-, Flavon-B₁- und Silychristin-acetat



4.3. Flavon-B₂-acetat

Ein in CDC1₃ aufgenommenes 80-MHz-NMR-Spektrum bestätigte mit den Resonanzsignalen bei 5.51 ppm und 3.12 bzw. 2.68 ppm, daß auch hier ein Flavanon vorlag. Die Aufspaltung entsprach der des erwarteten ABX-Systems mit den entsprechenden geminalen und vicinalen Kopplungskonstanten für H-2 und H-3_{ax} bzw. H-3_{eq}.

Durch Doppelresonanz-Experimente konnte diese Teilstruktur weiter erhärtet werden. Strahlte man im Bereich der geminalen H-3-Protonen ein, so wurde anstelle des ursprünglichen Dublett-Dublett-Signals für H-2 ein breites Singulett aufgezeichnet. Eine Sättigung des H-2-Kerns bei 5.51 ppm führte zur Ausbildung zweier Dubletts bei 3.1 ppm und 2.7 ppm, die von den nunmehr ausschließlich geminal mit 8 Hz koppelnden Kernen am C-3 stammten.

Daß auch im Falle von Flavon-B₂-acetat eine Verbindung vom Dihydrobenzofurantyp vorlag, zeigten die Signale bei 5.72 ppm, 3.8 ppm und 4.4 ppm, die auf Grund ihrer Verschiebungen und Spinkopplungsmuster den Protonen am C-α, C-β und C-γ zuzuordnen waren. Allerdings wies die Signalgruppe bei 4.4 ppm deutliche Unterschiede zu den bisher für H-γ beobachteten Resonanzsignalen auf. Während bei Flavon-A-, Flavon-B₁- und Silychristin-acetat im NMR-Spektrum dieser Feldstärke ein mehr oder weniger breites Dublett mit einer Kopplung von etwa 6 Hz registriert wurde, zeigte Flavon-B₂-acetat ein Multiplett, das sich von 4.1 ppm bis 4.7 ppm erstreckte.

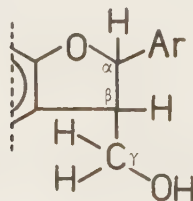
Um diese Zuordnung auch experimentell abzusichern, führten wir verschiedene Entkopplungsversuche durch. Als Lösungsmittel für diese Experimente wählten wir deuteriertes Benzol. Auf diese Weise gelang es, die vorher sich überlagernden und für vier Protonen integrierenden Signale bei 3.8 ppm

in ein scharfes Singulett bei 3.50 ppm und ein dazu diamagnetisch verschobenes Multiplett zu trennen, das nun in das Entkopplungsexperiment mit einbezogen werden konnte.

Ein Einstrahlen in der Höhe dieses Multipletts bewirkte eine Veränderung der Signale bei 5.52 ppm und 4.2 ppm (C_6D_6). Während das Dublett von 5.52 ppm nun als Singulett erschien, wurden für das bisherige Multiplett zwei Dubletts registriert, die beide eine Kopplungskonstante von 11 Hz aufwiesen. Strahlte man dagegen bei 5.52 ppm ein, so vereinfachte sich das Multiplett von 3.4 ppm zum Dublett-Dublett, wogegen die Signale bei 4.2 ppm unverändert als Multiplett auftraten.

Diese Ergebnisse sind nur erklärbar, wenn das bei 3.4 ppm registrierte Proton zwischen die bei 5.72 ppm und 4.2 ppm aufgezeichneten Wasserstoffkerne placiert wird und man damit zu einer Struktur gelangt, wie sie im Dihydrobenzofuran-Gerüst vorliegt (Abb. 21).

Abb. 21: Lösungsmittel-Shift der Dihydrobenzofuran-Protonen von Flavon-B₂-acetat (80 MHz)



	$CDCl_3$	C_6D_6	CD_3CN
H- α	5.72 ppm	5.52 ppm	5.70 ppm
H- β	~3.8 ppm	~3.4 ppm	~3.9 ppm
H- γ	~4.4 ppm	~4.2 ppm	~4.3 ppm

Damit war ein weiterer Beweis für die richtige Zuordnung der Protonen von C- α , C- β und C- γ erbracht (10).

Das 200-MHz-Spektrum von Flavon-B₂-acetat wurde in deuteriertem Acetonitril aufgenommen. Dieses Lösungsmittel bietet neben einer besseren Auflösung der Resonanzlinien den Vorteil, daß im Aromatenbereich kein andere Resonanzen überlagerndes Lösungsmittelsignal auftritt.

Neben den bereits beschriebenen Signalen, die vom Flavanon- und Dihydrobenzofuranteil herrührten, waren zwischen 2.16 ppm und 2.29 ppm die Singulets von fünf Acetylgruppen und eine Methoxygruppe bei 3.75 ppm zu erkennen.

In dem für aromatische Protonen typischen Bereich des Spektrums lagen bei 6.56 ppm und 6.74 ppm zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von je 2.2 Hz für zwei Protonen in meta-Position. Auf Grund der Literatur (10, 16, 27) waren diese eindeutig als H-6 und H-8 zu identifizieren. Auch für diese Verbindung war damit die Phloroglucin-Substitution des A-Rings gesichert.

Die folgenden Signale zeigten wieder die typischen Verschiebungen und Kopplungsmuster, wie sie für den Coniferylteil von Flavonolignanen bekannt sind (10). Während bei 6.88 ppm ein Dublett-Dublett mit $J_1 = 1.8$ Hz und $J_2 = 8$ Hz erschien, waren die jeweiligen Kopplungspartner als Dubletts mit $J = 1.8$ Hz und $J = 8$ Hz bei 7.02 ppm und 7.01 ppm zu beobachten.

Die beiden Dubletts bei 7.11 ppm und 7.16 ppm, die jeweils eine Kopplung von 8 Hz aufwiesen, stammten vom B-Ring. Da eine Kopplungskonstante dieser Größe als typisch für ortho-ständige Protonen gilt (28), war für Flavon-B₂-acetat eine gleiche Substitution im B-Ring anzunehmen, wie sie für das Isosilychristin beschrieben (18) und auch für das Flavon-A-acetat bestimmt worden war.

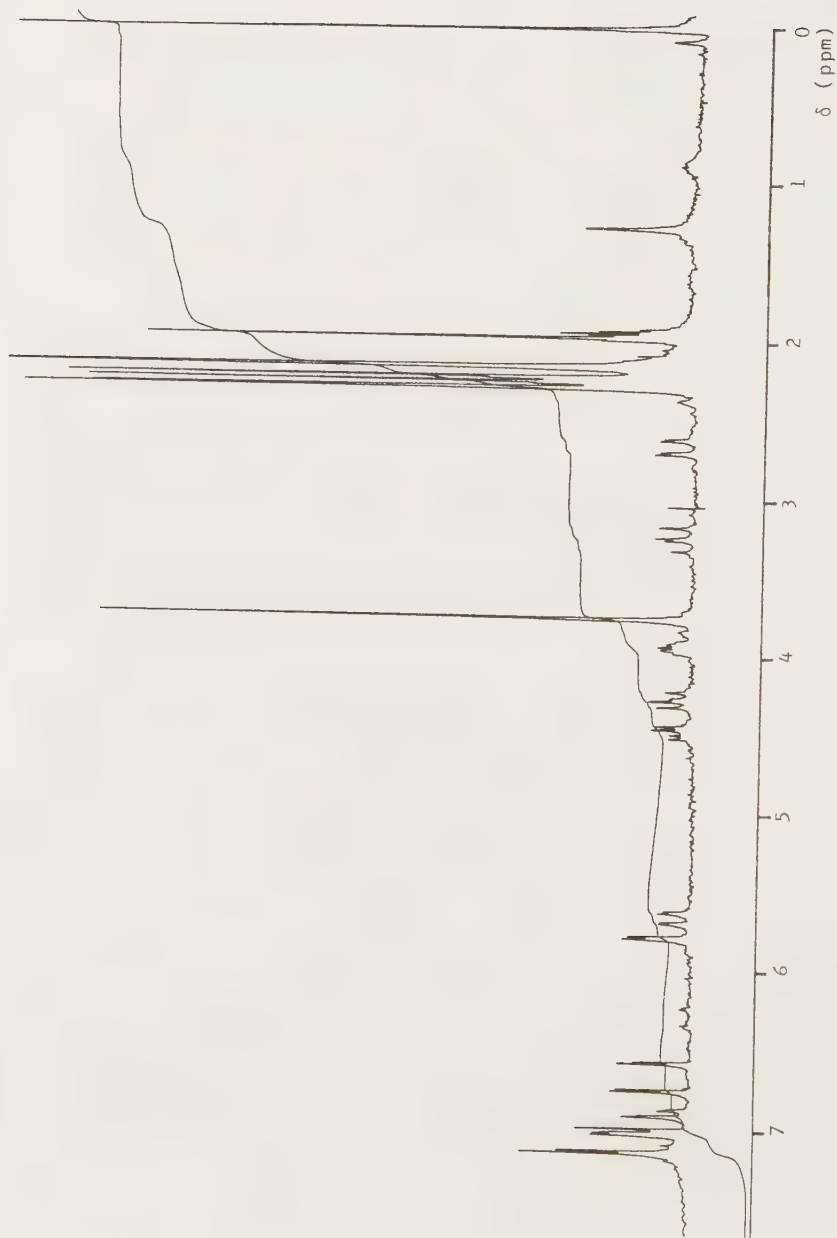


Abb. 22: ^1H -NMR-Spektrum von Flavon-B₂-acetat (200 MHz, CD_3CN , TMS int.)

Abb. 23: Flavon-B₂-acetat, Ausschnitt Aromaten im ¹H-NMR-Spektrum (200 MHz, CD₃CN)

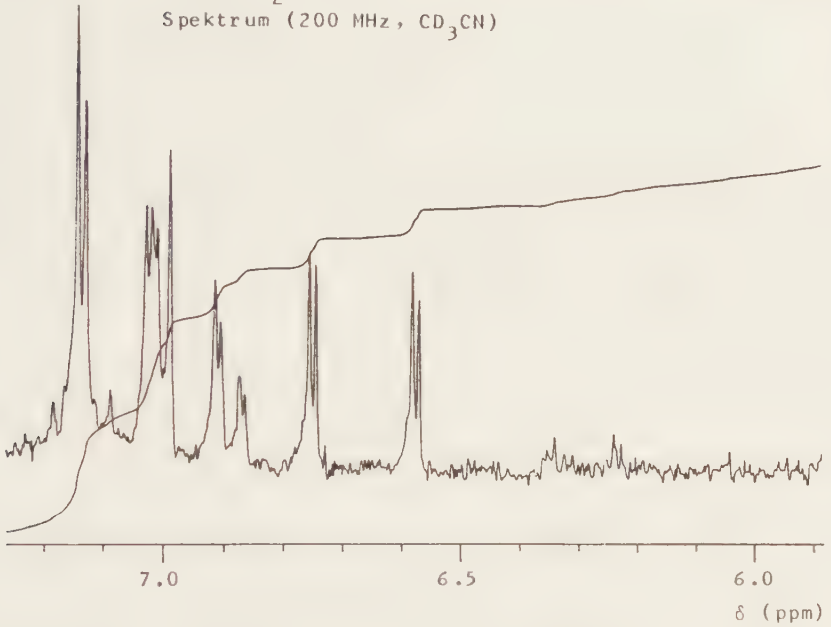
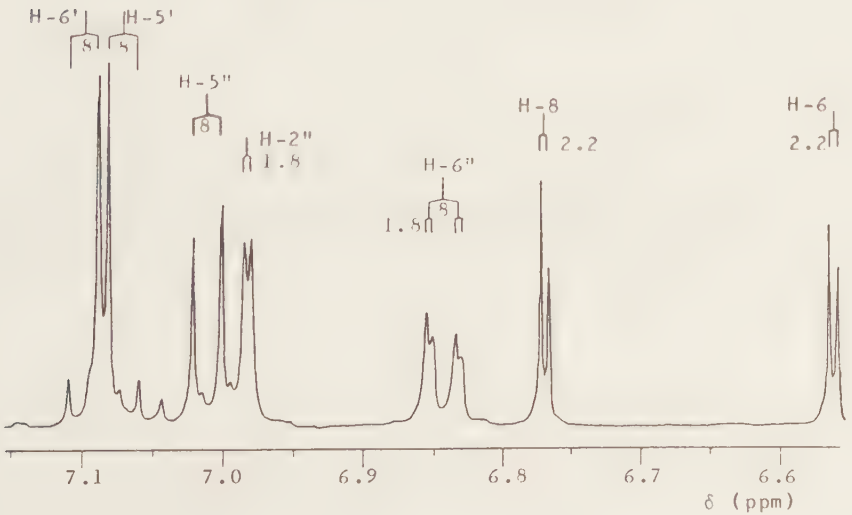


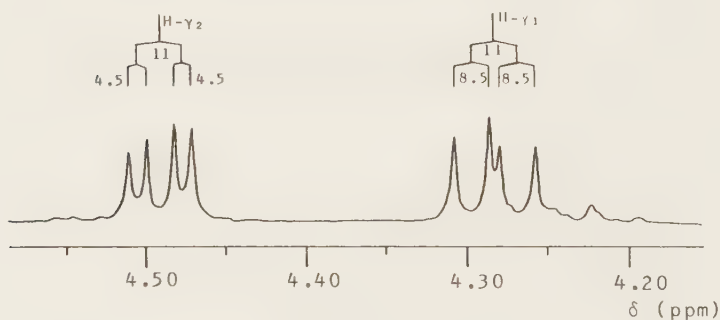
Abb. 24: Flavon-B₂-acetat, Ausschnitt Aromaten im ¹H-NMR-Spektrum (400 MHz)



Diese Struktur wurde durch die Aufnahme eines NMR-Spektrums bei 400 MHz bestätigt (Abb. 24, S. 49). Vor allem der aromatische Bereich war nun soweit aufgelöst, daß alle Spinsysteme eindeutig zu interpretieren und zuzuordnen waren.

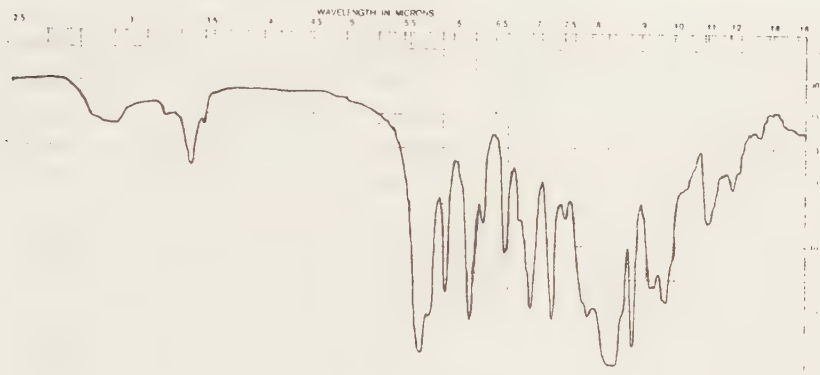
Die vorher bei geringerer Feldstärke als Multiplett registrierte Signalgruppe im Bereich von 4.4 ppm (CDCl_3) ließ sich als AB-Teil eines ABMX-Systems identifizieren. Es wird von den geminalen Protonen am C- γ zusammen mit den anderen Protonen am C- α und C- β durch Spin-Spin-Wechselwirkung gebildet.

Abb. 25: Flavon-B₂-acetat, Ausschnitt H- γ im ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz)



Auch das IR-Spektrum von Flavon-B₂-acetat erwies sich praktisch mit dem von Flavon-A-acetat als identisch (Abb. 26)

Abb. 26: IR-Spektrum von Flavon-B₂-acetat



Wie erwartet ließ sich auch im Massenspektrum von Flavon-B₂-acetat die enge Verwandtschaft zu Flavon-A- und Flavon-B₁-acetat erkennen. Weder in der Lage des Molekülions noch im Fragmentierungsmuster der Substanz waren Unterschiede zu beobachten.

Damit kann für Flavon-B₂-acetat die Struktur eines 3-Desoxy-Isosilychristin-pentaacetats angegeben werden.

Der chemische Nomenklaturvorschlag wäre:

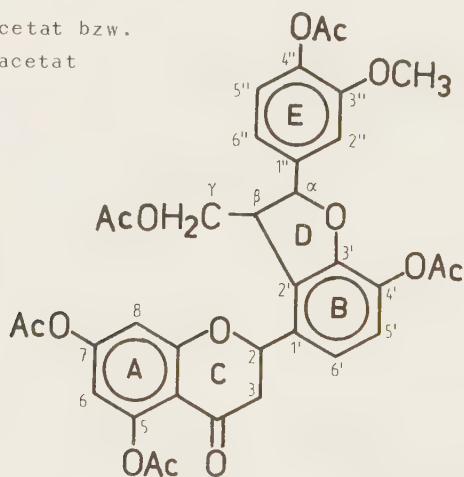
2-[2,3-Dihydro-2-(3-methoxy-4-acetyl-phenyl)-3-acetyl-methyl-benzofuranyl-4]-5,7-diacetyl-chromanon-4.

Von dem Flavon-A-acetat (siehe 4.1.) konnte es sich demnach nur in der Stereochemie unterscheiden.

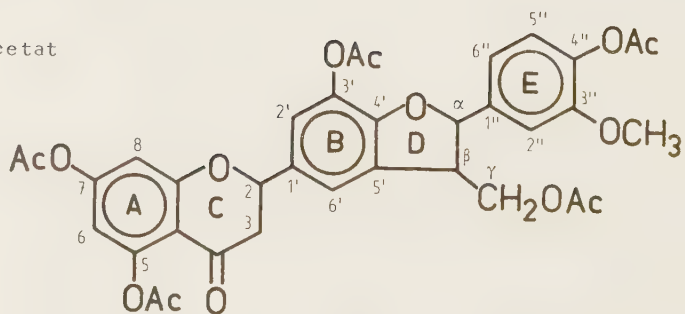
Abb. 27: Konstitution der isolierten Isomere Flavon-A-,
Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat

Flavon-A-acetat bzw.

Flavon-B₂-acetat



Flavon-B₁-acetat



5. Stereochemie

5.1. Stereochemie bisher bekannter Flavonolignane

Nach den vorhergegangenen Untersuchungen konnte "Flavon G" über seine Acetate in drei Verbindungen aufgetrennt werden, die zueinander isomer sind. Während Flavon-A- und Flavon-B₂-acetat der Isosilychristin-Reihe angehören und sich nur stereochemisch unterscheiden, stellt Flavon-B₁-acetat als Vertreter des Silychristintyps ein Regioisomer dazu dar.

Alle drei Flavonolignane besitzen ein Chiralitätszentrum im Flavanonteil (C-2) und zwei weitere im Dihydrobenzofuranring (C- α und C- β). Theoretisch wären somit acht optische Isomere denkbar.

Daß Verbindungen der Flavonolignan-Reihe in verschiedenen isomeren Formen vorliegen, ist nicht neu. Seit der Röntgenstrukturanalyse des Silydianins im Jahre 1970 durch ABRAHAM u. Mitarb. (31) war es möglich, für eine Reihe ähnlicher Verbindungen deren Konfigurationen sowohl im C-Ring als auch im Coniferylteil festzulegen (105). Während im Coniferylteil alle bisher bekannten Flavonolignane eine trans-Stellung der Substituenten am C- α und C- β aufweisen, zeigen alle Vertreter der Flavanonolreihe im C-Ring die typische trans-pseudo-equatoriale Substituentenanordnung am C-2 und C-3.

Für Silydianin wurde aus NMR-Untersuchungen und der Röntgenstruktur als absolute Konfiguration 2R 3R und α R β R abgeleitet.

Silybin liegt nach der Röntgenanalyse als Diastereomergemisch und partielles Racemat mit der absoluten Konfiguration 2R 3R und α R β R bzw. 2R 3R und α S β S vor (22).

Dasselbe gilt für das Regioisomer Isosilybin (98, 99).

Das Silychristin besitzt im Flavanonteil ebenfalls die 2R 3R-Konfiguration. Für den Dihydrobenzofuranteil wurde nach CD-Untersuchungen der Dehydro-Verbindung die α R β S-Konfiguration abgeleitet (32).

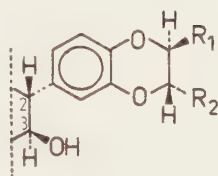
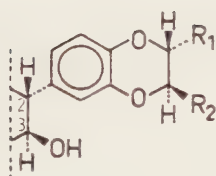
Für Silandrin und Silymonin wurde im C-Ring die für fast alle übrigen natürlich vorkommenden Flavanone gültige 2S-Konfiguration gemessen (5).

Tab. 2: Stereochemie bisher bekannter Flavonolignane (105)

Substanz	Konfiguration		Komponenten
	C-Ring	Coniferylteil	
Silybin	2R 3R	α R β R	A 1:1
	2R 3R	α S β S	B
Isosilybin	2R 3R	α R β R	A 1:1
	2R 3R	α S β S	B
Silychristin	2R 3R	α R β S	1 (+?)
Isosilychristin	2R 3R	trans	1 (+?)
Silydianin	2R 3R	α R β R	1
Silandrin	2S	trans	2
Silymonin	2S	α R β R	1

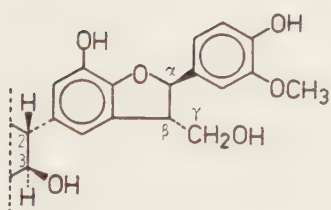
Die Bezeichnung nach CAHN-INGOLD-PRELOG (33, 97) mit einmal 2R und einmal 2S ist nur durch die unterschiedliche Priorität der Nachbaratome von C-2 bedingt. Diese wird bei Flavanonolen durch die zusätzliche OH-Gruppe am C-3 so verändert, daß die gleiche Konfiguration am C-2-Atom im Falle von Flavanonen als 2S und bei Flavanonolen als 2R bezeichnet wird.

Abb. 28: Stereochemie der Flavonolignane

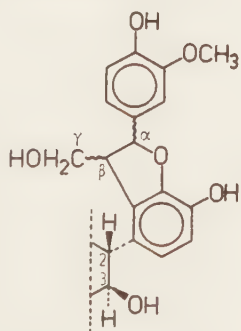


	R ₁	R ₂
Silybin A	-CH ₂ OH	-Ar
Isosilybin A	-Ar	-CH ₂ OH

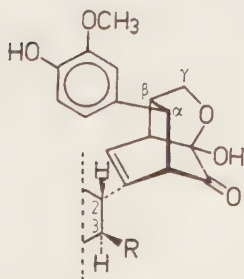
	R ₁	R ₂
Silybin B	-CH ₂ OH	-Ar
Isosilybin B	-Ar	-CH ₂ OH



Silychristin

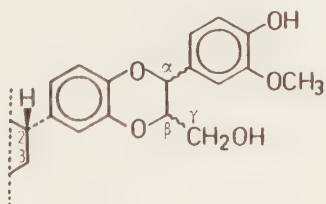


Isosilychristin



Silydianin R = OH

Silymonin R = H



Silandrin

5.2. Bestimmung der optischen Drehung

Alle drei isolierten Substanzen waren optisch aktiv und zeigten in Lösung positive Drehwerte (Tab. 3).

Tab. 3: Drehwerte der isolierten Substanzen

Substanz	Optische Drehung $[\alpha]_D^{26}$
Flavon-A-acetat	+ 34.8 ° (c = 0.315, CHCl ₃)
Flavon-B ₁ -acetat	+ 29.9 ° (c = 0.283, CHCl ₃)
Flavon-B ₂ -acetat	+124.8 ° (c = 0.255, CHCl ₃)

Diese Beobachtung war insofern ungewöhnlich, als Flavanone im allgemeinen linksdrehend sind, was für eine 2S-Konfiguration spricht. Analog gilt für Flavanone mit positivem Drehsinn, daß mit einer 2R-Konfiguration zu rechnen ist (16).

Diese Regel trifft ohne Einschränkung allerdings nur auf einfache Flavanone mit einem Chiralitätszentrum zu. Die Konfigurationsangabe ist erschwert, wenn weitere asymmetrische Zentren im Molekül vorhanden sind.

GAFFIELD konnte zeigen, daß bei zwei diastereomeren linksdrehenden Naringin-Proben mit enantiomeren Aglyca die Linksdrehung durch die jeweils in derselben Konfiguration vorliegenden Zuckeranteile bewirkt wurde, obwohl einmal 2S- und einmal 2R-Konfiguration vorgelegen hatte (34). Im Bereich der Flavonolignane war bei Silymonin ein ähnlicher Effekt zu beobachten. Obwohl das Molekül einen positiven Drehwert aufweist, kommt ihm eine 2S-Konfiguration zu, wie die CD-Messung zweifelsfrei ergab (5).

Tab. 4: Drehwerte bisher bekannter Flavonolignane

Substanz	Optische Drehung	Lit.
Silybin	+ 11 ° (Aceton)	(9)
Isosilybin	+ 16.9 ° (c = 0.15, Aceton)	(98, 99)
Silychristin	+ 81.4 ° (c = 0.855, Pyridin)	(10)
Isosilychristin	+245 ° (c = 0.1, Pyridin)	(18)
Silydianin	+175 ° (c = 1.094, Aceton)	(10)
Silandrin	- 42.7 ° (c = 0.506, Pyridin)	(5)
Silymonin	+127 ° (c = 0.505, Pyridin)	(5)

Aus den positiven Drehwerten von Flavon-A-, Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat (Tab. 3) konnte geschlossen werden, daß entweder

- Flavanone mit 2R-Konfiguration, oder
- Flavanone mit 2S-Konfiguration vorlagen, deren Asymmetriezentren im Dihydrobenzofuranteil eine so starke Rechtsdrehung bewirken, daß der Nettowert aller Drehmomente jeweils positiv wird.

5.3. Bestimmung des Circular dichroismus (CD)

Eine Klärung dieser Frage sollte durch CD-Messung zu erreichen sein. Nach den umfangreichen Untersuchungen von GAFFIELD kann aus dem Cotton-Effekt um 290 nm und 330 nm eindeutig auf die Konfigurationsverhältnisse im C-Ring eines Flavanons bzw. Flavanonols geschlossen werden.

Erscheint bei Flavanonen im Bereich von 290 nm ein negativer und bei 330 nm ein positiver Cotton-Effekt, so handelt es sich um ein Molekül mit 2S-Konfiguration. Im umgekehrten Fall, wenn die Vorzeichen der Cotton-Effekte vertauscht sind, muß eine Verbindung mit 2R-Konfiguration vorliegen (34).

Wie aus Tab. 5 hervorgeht, besitzen alle bisher bekannten Flavonolignane auf Grund der CD-Kurven eine 2S-Flavanon- bzw. eine 2R-Flavanonol-Konfiguration. In jedem Fall entspricht die CD-Kurve dem von GAFFIELD angegebenen Bild für einfache Flavanone oder Flavanonole. Hieraus ist die dominierende Rolle des C-Ring-Chromophors gegenüber dem Coniferylteil ersichtlich.

Tab. 5: CD-Werte bisher bekannter Flavonolignane

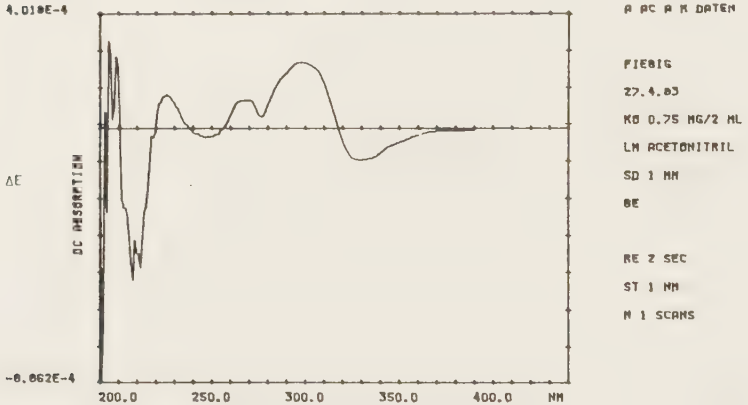
Substanz	$\lambda_{\max} (\Delta\epsilon)$	Lit.
Silybin	330(+2.2), 295(-8.8), 255(+1.7)	(98)
Isosilybin	330(+2.2), 295(-10.1), 255(+1.7)	(98)
Silychristin	332(+2.61), 299(-8.01), 257(+2.97), 226(+9.6), 209(+9.9)	(10)
Isosilychristin	330(+0.81), 302(-3.27), 282(+4.32), 268(+4.93), 217(+64.8)	(18)
Silydianin	345(+0.51), 303(-6.72), 281(-3.77), 260(-0.87), 225(+22.7)	(10)
Silandrin	327(+4.54), 291(-12.49), 247(+1.79), 221(+8.9)	(5)
Silymonin	314(-7.5), 280(-10.6), 212(+63.7)	(5)

Bei der CD-Messung von Flavon-A-, Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat ergaben sich folgende Kurvenbilder (Abb. 29, S. 60):

Abb. 29: CD-Kurven der isolierten Verbindungen

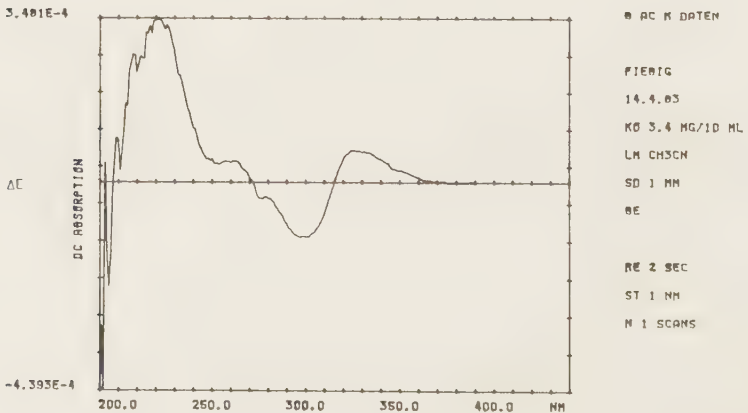
Flavon-A-acetat:

$\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 340 \text{ nm}(-3.15), 308(+6.69), 280(+3.54), 256(-0.93), 236(+2.8), 222(-14.1).$



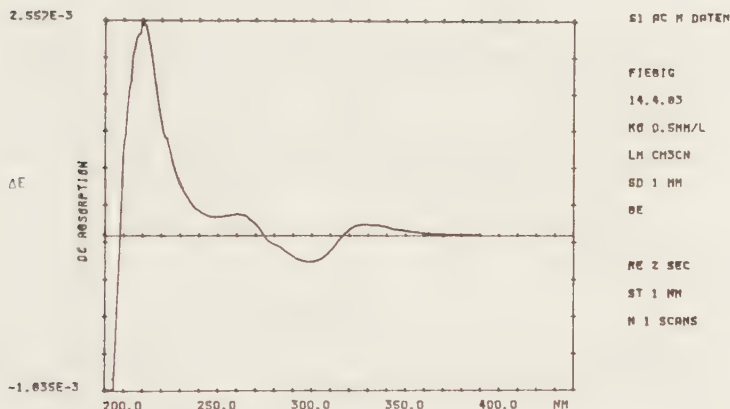
Flavon-B₁-acetat:

$\lambda_{\max} (\Delta\epsilon) = 336 \text{ nm}(+2.21), 310(-3.66), 286(-1.07), 270(+1.38), 230(+11.1)$



Flavon-B₂-acetat:

$\lambda_{\max}(\Delta\epsilon) = 338 \text{ nm}(+4.22), 310(-9.84), 286(-2.82),$
 $270(+8.14), 220(+81.8)$



Um auszuschließen, daß sich die acetylierten Produkte stereochemisch von den genuinen Verbindungen unterschieden, wurden zur Sicherheit die CD-Kurven von Silychristin-hexa-acetat und der nichtacetylierten G/A-Fraktion (siehe 2.7.) aufgenommen und mit den Kurven von Silychristin bzw. Flavon-A-acetat verglichen. In beiden Fällen entsprachen die Kurvenbilder der acetylierten Verbindungen denen der nichtacetylierten Substanzen (vgl. Exp. Teil, 5.1.7.).

Die Auswertung der CD-Untersuchung führte zu folgenden Ergebnissen:

- a) Die Acetylierung der Substanzen hatte zu keinen grundsätzlichen Änderungen der CD-Kurven geführt und somit keinen Einfluß auf die Konfigurationsverhältnisse.
- b) Die CD-Kurven von Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat sind praktisch deckungsgleich und unterscheiden sich nicht von dem Bild, das Silychristin-hexaacetat liefert. Somit ist für Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat jeweils die 2S-Konfiguration zu postulieren, wie sie bisher für alle natürlichen Flavanone mit wenigen Ausnahmen ermittelt wurde (35).
- c) Der Kurvenverlauf bei Flavon-A-acetat zeigt, daß in dieser Verbindung der seltene Fall eines 2R-Flavanons vorliegt. Die Cotton-Effekte waren hier exakt bei denselben Wellenlängen wie bei Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat zu beobachten, nur mit vertauschten Vorzeichen.

5.4. ¹H-NMR-Spektroskopie

5.4.1. Bestimmung der Konfigurationen im Dihydrobenzofuranring

Nachdem die Stereochemie im Flavanonteil feststand, wurden die Konfigurationsverhältnisse im Dihydrobenzofuranring untersucht.

Aus den bereits diskutierten Gründen war es hier nicht möglich, ohne weitere Veränderungen am Molekül mit Hilfe von optischer Drehung oder CD-Untersuchungen allein Entscheidungen zu treffen. Mehr Aussagen sollten aus den

^1H -NMR-Spektren ableitbar sein.

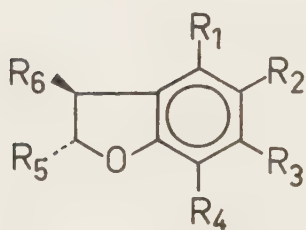
Im Gegensatz zu einigen Literaturen (36, 37) ist beim Vorliegen zweier Isomere vom Dihydrobenzofurantyp dem Isomer mit der größeren Kopplungskonstanten nicht immer die cis-Verbindung zuzuordnen.

Untersuchungen haben gezeigt, daß trans-Isomere infolge unterschiedlicher Konformationen größere (38, 39), gleichgroße (40) oder kleinere Kopplungskonstanten (41) als die entsprechenden cis-Verbindungen besitzen können. Allgemein werden für $^3J_{\text{cis}}$ Werte zwischen 4.5 und 10 Hz gefunden, wogegen bei trans-Kopplungen Hz-Werte für $^3J_{\text{trans}}$ von 0 bis 11 auftreten können. Erklärt werden kann diese Beobachtung mit den unterschiedlichen Diederwinkeln, die nach der KARPLUS-Beziehung (96) zu den entsprechenden Kopplungskonstanten führen.

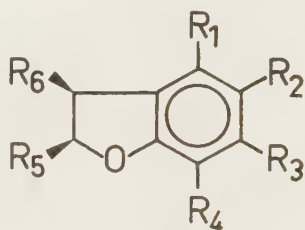
Daraus ergibt sich, daß nur für Kopplungen mit $^3J < 4$ Hz der Schluß auf das Vorliegen einer trans-Verbindung erlaubt ist (42).

Eine genauere Methode zur Unterscheidung von cis- und trans-Isomeren bot ein Vergleich der chemischen Verschiebungen der vicinalen Protonen. Allgemein wird beobachtet, daß Protonen, die vicinal zu einem Substituenten stehen, in cis-Stellung stärker abgeschirmt sind als trans-ständige Protonen. Dieser Effekt drückt sich in einer diamagnetischen Verschiebung des Protons in cis-Position aus, wogegen trans-angeordnete Protonen, bei denen sich der Abschirmeffekt weniger auswirkt, bei tieferem Feld in Resonanz treten (39, 42). (39, 42). Ausführliche Arbeiten von GÖTTLIEB u. Mitarb. sowie anderer Autoren, die zur Struktur- und Konfigurationsaufklärung verschiedener cis/trans-Isomere vom Dihydrobenzofurantyp geführt hatten, belegten diese Aussage (Tab. 6, 7, S. 64/65).

Tab. 6: Cis/trans-Isomere vom Dihydrobenzofurantyp aus der Literatur



trans



cis

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Lit.
Obtusafuran	H	OH	OCH ₃	H	Ar	CH ₃	(40)
Substanz 5/6d	CH ₃	H	H	H	Iso- amyl	CH ₃	(41)
Substanz 19	H	CH ₃	H	H	Vinyl	CH ₃	(39)
Substanz 23	H	CH ₃	H	H	Ethyl	CH ₃	(39)
Substanz 1d/3a	H	OCH ₃	O-Allyl	H	Ar	CH ₃	(43)
Substanz 1f/3b	H	OCH ₃	OH	Allyl	Ar	CH ₃	(43)
Substanz 1g/3c	H	OCH ₃	OH	Allyl	Ar	CH ₃	(43)
Substanz 1i/3d	H	OCH ₃	OH	H	Ar	CH ₃	(43)
Substanz 1j/3e	H	OCH ₃	OH	H	Ar	CH ₃	(43)
Substanz 1k/3f	H	OCH ₃	OH	Allyl	Ar	CH ₃	(43)

Tab. 7: ^1H -NMR-Daten der Verbindungen aus Tab. 6

Substanz	Rel. Konfig.	H-2 (δ)	H-3 (δ)	$J_{2,3}$ (Hz)	3-CH ₃ (δ)
Obtusafuran	trans	5.10	3.1-3.6	8	1.37
"	cis	5.73	-	8	0.74
Substanz 6d	trans	4.25	3.10	4.8	1.28
" 5	cis	4.42	3.22	7	1.07
Substanz 19	trans	4.46	2.9-3.3	8.5	1.28
" 19	cis	5.00	3.55-3.1	8.5	1.09
Substanz 23	trans	4.06	3.01	8	1.27
" 23	cis	4.38	3.16	5.4	1.05
Substanz 1d	trans	5.02	3.03-3.53	8.0	1.38
" 3a	cis	5.70	3.24-3.73	8.0	0.83
Substanz 1f	trans	5.07	3.0-3.5	8.0	1.33
" 3b	cis	5.24	3.8-4.3	8.0	0.81
Substanz 1g	trans	4.91	3.08-3.45	8.0	1.33
" 3c	cis	5.56	3.17-3.80	8.0	0.76
Substanz 1i	trans	4.90	3.06-3.46	8.0	1.33
" 3d	cis	5.53	3.26-3.63	8.0	0.76
Substanz 1j	trans	4.75	3.06-3.47	8.0	1.36
" 3e	cis	5.58	3.18-3.58	8.0	0.78
Substanz 1k	trans	4.93	3.08-3.45	8.0	1.35
" 3f	cis	5.61	3.30-3.53	8.0	0.76

Trans-Obtusafuran sowie die Substanzen 1d,f,g und 3a,b,c sind aus *Dalbergia obtusa* (Leguminosae) und verschiedenen Aniba-Arten (Lauraceae) isoliert worden. Bei den übrigen Substanzen handelt es sich um vollsynthetische Verbindungen (cis-Obtusafuran, Substanz 5, 6d, 19, 23) oder um Substanzen, die durch Pyrolyse aus natürlich vorkommenden Verbindungen erhalten wurden.

Die Tabelle 7 zeigt, daß das Proton am C-2 bei deutlich kleineren δ -Werten in Resonanz tritt, wenn die Substituenten in trans-Stellung angeordnet waren.⁺⁾ Dies bedingte in jedem Falle eine cis-Stellung der C-2- und C-3-Protonen zu den Substituenten, was zu einer Abschirmung und damit diamagnetischen Verschiebung dieser Signale führte. Der Unterschied zwischen cis- und trans-Isomeren drückt sich in einer Differenz der Resonanzlagen von Δ ppm 0.17 - 0.83 aus.

Dieselbe Überlegung erklärt, weshalb das Proton am C-3 bei trans-Verbindungen eine kleinere chemische Verschiebung als in den entsprechenden cis-Isomeren aufweist.

Der umgekehrte Fall gilt für die Substituenten selbst. Die Methylgruppe am C-3 wird bei trans-Verbindungen weniger abgeschirmt und erscheint deshalb bei höheren ppm-Werten. Steht sie dagegen in cis-Position zum Substituenten am C-2, so erfolgt wegen der stärkeren Abschirmeffekte die Resonanz bei höherem Feld.

Für das Flavonolignan Isosilychristin war auf Grund seiner Kopplungskonstanten $^3J_{\alpha\beta}$ von 2 Hz eine trans-Substitution an C- α und C- β eindeutig festgelegt (18). Somit stellt acetyliertes Isosilychristin eine Referenzsubstanz mit trans-Konfiguration im Dihydrobenzofuranring dar, deren chemische Verschiebungen im NMR mit den experimentell ermittelten δ -Werten für Flavon-A-, Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat verglichen werden konnten.

⁺⁾ Die im Dihydrobenzofuran mit H-2 und H-3 bezeichneten Protonen entsprechen in ihrer Stellung den H- α - und H- β -Protonen des Coniferylteils von Flavonolignan. Die 3-CH₃-Gruppe (Tab. 7) entspricht strukturell den H- γ -Protonen.

Wenn für die drei neuen Verbindungen eine trans-Anordnung der Protonen im Coniferylteil zutrifft, so muß dies entweder aus einer Kopplungskonstanten mit $^3J_{\alpha\beta} < 4$ Hz oder einer von Isosilylchristin-acetat nicht wesentlich abweichenden chemischen Verschiebung δ ersichtlich sein (Tab. 8).

Tab. 8: Chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten von Dihydrobenzofuran-Flavonolignan (200 MHz)

Substanz	LM	H- α (δ)	H- β (δ)	$J_{\alpha\beta}$ (Hz)	H- γ_1, γ_2 (δ)
Flavon-A-acetat	CDCl ₃	5.66	3.9	3.5	4.37
Flavon-B ₁ -acetat	CDCl ₃	5.60	3.8	6	4.4
Flavon-B ₂ -acetat	CDCl ₃	5.72	3.8	3	4.28, 4.49
"	CD ₃ CN	5.70	3.9	3	4.26, 4.47
Isosilylchristin-acetat	CD ₃ CN	5.82	3.8	2.5	4.28 - 4.43
Silylchristin-acetat	CDCl ₃	5.61	3.8	6.0	4.38

Wie aus Tab. 8 ersichtlich ist, liegen die Kopplungskonstanten $J_{\alpha\beta}$ für Flavon-A- und Flavon-B₂-acetat in einer Größenordnung, die auf eine trans-Anordnung der Protonen und damit auch der Substituenten am C- α und C- β schließen läßt.

Im Falle von Flavon-B₁-acetat ist aus der Kopplung von 6 Hz allein nicht zu entscheiden, welche relative Konfiguration vorliegt.

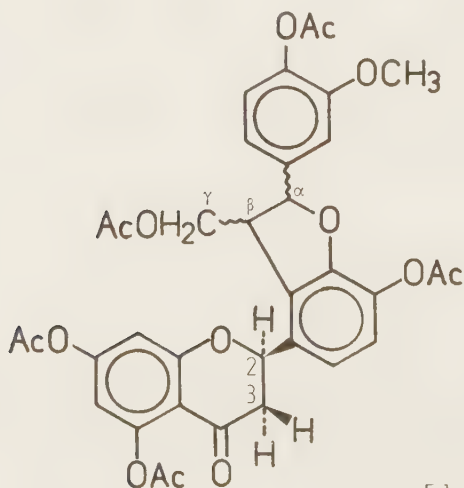
Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen aller α -Protonen brachte noch keine Entscheidung, da die geringen Unterschiede in den Werten keine eindeutige Zuordnung erlaubten.

Die praktisch gleichen Resonanzlagen der Signale für H- β deuten im Vergleich zu Isosilychristin-acetat auf einen ähnlichen Aufbau des Dihydrobenzofuranrings und damit auf trans-Konfiguration der Substituenten hin.

Die gefundenen Werte für H- γ_1, γ_2 belegen am deutlichsten diese Struktur. Während hier für cis/trans-Isomere signifikante Unterschiede in ihren Verschiebungen zu erwarten gewesen wären (siehe Tab. 7, S. 65), war die Differenz zwischen Isosilychristin-acetat und den drei isolierten Isomeren minimal.

Aus diesem Grund müssen Flavon-A-, Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat bezüglich ihrer Substituenten an C- α und C- β trans-Konfiguration besitzen.

Abb. 30: Konfigurationsverhältnisse der isolierten Isomere



5.4.2. Bestimmung der Konformation

Zur Bestimmung der Konformation ließ sich ebenfalls die ^1H -NMR-Untersuchung heranziehen.

Bei allen drei Isomeren konnte für H-2 und ein Proton am C-3 eine Kopplung mit 13 Hz nachgewiesen werden. Eine Konstante dieser Größenordnung läßt sich nur durch trans-diaxiale Anordnung dieser Protonen und damit einen pseudo-equatorial orientierten Aromaten am C-2 erklären.

Auch für den Dihydrobenzofurananteil können auf Grund des $^3J_{\alpha\beta}$ -Wertes Aussagen über dessen Konformation gemacht werden. Kopplungskonstanten, die wesentlich über 3 Hz liegen, erfordern wegen der Diederwinkel bei trans-Substitution zwingend trans-pseudoaxiale Protonen an C- α und C- β . Daraus folgt ein pseudoequatorial stehender Guajacylrest und "Briefumschlag"-Konformation des Fünfrings. Deshalb ist für Flavon-B₁-acetat mit einer Kopplungskonstanten von $^3J_{\alpha\beta} = 6 \text{ Hz}$ eine derartige Substituentenanordnung zu postulieren.

Analog läßt sich eine kleine Kopplungskonstante nur erklären, wenn der Torsionswinkel ϕ zwischen H- α und H- β im Bereich von 90° liegt. Dies kann bei trans-Konfiguration nur der Fall sein, wenn die Protonen an C- α und C- β trans-pseudoequatorial und die Substituenten damit trans-pseudoaxial angeordnet sind. Aus diesem Grund ist für Flavon-A- und Flavon-B₂-acetat mit $^3J_{\alpha\beta} = 3.5 \text{ Hz}$ bzw. 3 Hz eine solche Konformation anzugeben.

Zusammenfassend ergibt sich für die Stereochemie von Flavon-A-, Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat folgendes:

- a) Im Flavanonanteil ist auf Grund der CD-Messung die absolute Konfiguration von Flavon-B₁- und Flavon-B₂-acetat als 2S anzugeben. Flavon-A-acetat besitzt 2R-Konfiguration und stellt damit das erste Flavonolignan mit einem derart strukturierten C-Ring dar.
- b) Aus den NMR-Daten läßt sich für alle drei Isomere eine trans-Anordnung der Substituenten an C- α und C- β postulieren.
- c) Da Flavon-A- und Flavon-B₂-acetat am C-2 unterschiedliche absolute Konfigurationen aufweisen und deren relative Konfiguration im Fünfring als trans anzugeben ist, müssen beide Verbindungen entweder enantiomer oder diastereomer sein. Auf Grund der Meßergebnisse von HPLC und optischer Rotation sind Enantiomere auszuschließen. Deshalb muß es sich bei Flavon-A- und Flavon-B₂-acetat um Diastereomere mit derselben absoluten Konfiguration an C- α und C- β handeln.
- d) Durch die Karplus-Gleichung wurden für alle drei Isomere aus $^3J_{\alpha\beta}$ die Torsionswinkel und damit die Konformationen im Flavanon- und Dihydrobenzofuranteil bestimmt. Während am C-2-Atom der Aromat in allen Fällen pseudoequatorial orientiert ist, steht der Guajacylrest am C- α bei Flavon-A- und Flavon-B₂-acetat trans-pseudoaxial und bei Flavon-B₁-acetat trans-pseudoequatorial.

6. Weitere neue Inhaltsstoffe

6.1. Eriodictyol

Während der chromatographischen Voruntersuchung des MeOH-Extrakts aus Früchten der weißblühenden *Silybum-marianum*-Varietät war aufgefallen, daß im Chromatogramm ein Fleck unterhalb von Silandrin nach Besprühen mit Naturstoff-PÄG-Reagenz im UV 360 intensiv rot fluoreszierte. Nach einem Zeitraum von mehreren Stunden war diese Zone als kräftig violetter Fleck im Tageslicht sichtbar (siehe Abb. 6, S. 15, Zone Nr. 3).

Im Zuge der Isolierung von Flavon G (siehe 2.5.) ließen sich 5 mg dieser zunächst unbekannten Substanz mittels präparativer DC rein gewinnen.

Aus dem UV-Spektrum war ersichtlich, daß ein Flavanon oder Flavanonol vorliegen mußte. Die bathochrome Verschiebung des Maximums nach Zugabe von NaOMe von 289 nm auf 326 nm deutete auf eine 5,7-Dihydroxy-Substitution hin.

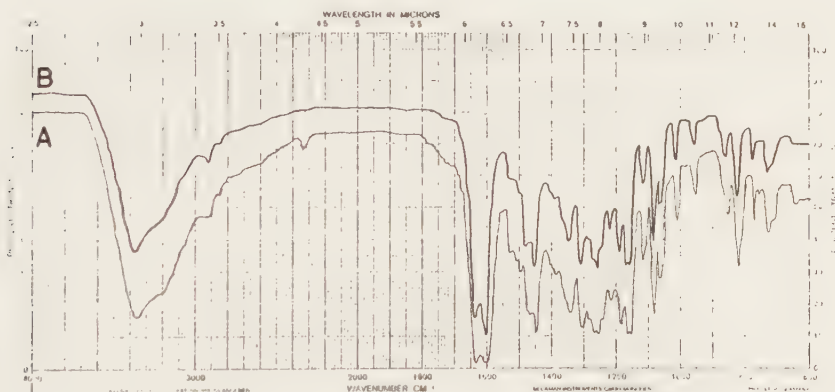
Der negative Ausfall des PEW-Tests (siehe 2.2.) ließ eine Flavanon-Struktur vermuten.

Ein Massenspektrum der Verbindung lieferte den eindeutig zu identifizierenden Molekülpeak bei m/e 288. Die weitere Fragmentierung verlief in der von vielen Autoren für Flavanone typisch beschriebenen Weise (27, 44). So deutete das Signal bei m/e 153 auf einen dihydroxy-substituierten A-Ring des Moleküls, der nach RDA-Zerfall entstand. Das für die Aufklärung der B-Ring-Substitution besonders wichtige B₃-Fragment wurde bei m/e 136 registriert. Aus den 136 Masseneinheiten ließ sich eine Dihydroxy-Substitution auch im B-Ring herleiten. Als vorliegende Verbindung kam somit nur Eriodictyol (5,7,3',4'-Tetrahydroxy-flavanon) oder ein zu ihm isomeres Flavanon in Frage.

Eine DC der isolierten Substanz mit authentischem Eriodictyol in LM I, II und III sowie vergleichende HPLC und IR-Spektroskopie bestätigten die Identität mit Eriodictyol.

Der Schmelzpunkt der Substanz lag bei 258 °C, was den Literaturangaben für Eriodictyol entsprach (45).

Abb. 31: IR-Überlagerungsspektrum von isolierter Substanz (A) und authentischem Eriodictyol (B)



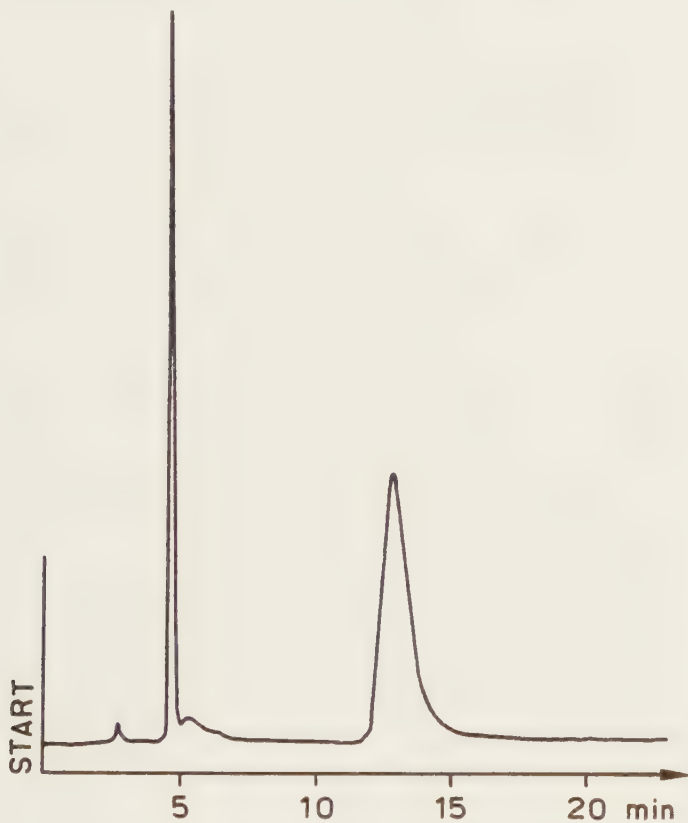
Mit Eriodictyol war somit das Flavanon isoliert worden, das die Vorstufe in der Biosynthese von 3-Desoxy-Flavonolignanen darstellt.

6.2. Naringenin

Eine weitere, bisher nicht identifizierte Zone (Nr. 6 in Abb. 6, S. 15) lag im Dünnschichtchromatogramm bei Verwendung von LM I direkt unterhalb des 5,7-Dihydroxychromons. Sie zeigte im UV 254 eine schwache Löschung und fluoreszierte nach Detektion mit Naturstoff-PÄG-Reagenz schwach gelbgrün. Eine Isolierung dieser als Substanz E bezeichneten Zone erwies sich zunächst als schwierig, da in LM I und II starke Überlappungen mit dem im selben R_f -Bereich aufgetrennten Chromon auftraten und alle Versuche, mit modifizierten Laufmittelsystemen eine verbesserte Trennung zu erreichen, zu keinem befriedigenden Ergebnis führten.

Schließlich wurde so verfahren, daß zunächst durch präparative DC die Mischzone aus Substanz E und 5,7-Dihydroxychromon auf übliche Weise gewonnen und eluiert wurde. Die HPLC-Analyse der eingeeengten Lösung bestätigte, daß das isolierte Produkt aus zwei Verbindungen bestand, deren eine durch Vergleich der Retentionszeiten mit authentischem 5,7-Dihydroxychromon eindeutig zuzuordnen war. Durch ein Variieren der mobilen Phase gelang es uns, die Differenz der Retentionszeiten beider Verbindungen soweit zu erhöhen, daß selbst ein Überladen der Trennsäule durch Injizieren im präparativen Maßstab die Grundlinientrennung nicht beeinträchtigte. Da in der HPLC bei der Trennung von Polyphenolen im allgemeinen ein Säurezusatz aus Gründen der Trennschärfe erforderlich ist, dieser andererseits bei präparativem Arbeiten zu Problemen führen kann (siehe 2.7.), versuchten wir mit Erfolg die Trennung im säurefreien System MeOH-H₂O im Verhältnis 4 : 6 (Abb. 32). Aus den aufgefangenen Fraktionen kristallisierten 3 mg farblose Stäbchen.

Abb. 32: HPLC-Chromatogramm der durch präparative DC gewonnenen Mischzone



Geräte- und Trennparameter: siehe Exp. Teil 3.3.2. b)

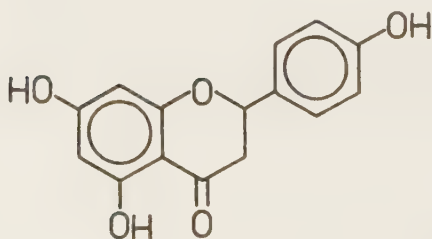
Aus dem UV-Spektrum war zu entnehmen, daß ein Flavanon oder Flavanonol vorliegen mußte. Die Verschiebung des Maximums von 288 nm auf 323 nm nach Zugabe von NaOMe sprach für eine 5,7-Dihydroxy-Substitution.

Im Massenspektrum der Substanz wurde der Molekülpeak mit 74 % relativer Intensität bei m/e 272 registriert. Das Molekulargewicht des Flavanon-Grundkörpers beträgt 224; für Substituenten standen somit 48 Masseneinheiten zur Verfügung, was genau der Masse von drei OH-Gruppen entsprach. Nachdem die UV-Untersuchung eine 5,7-Dihydroxy-Substitution ergeben hatte und der PEW-Test negativ ausfiel, war eine Monohydroxy-Substitution des B-Rings anzunehmen.

Die weitere Fragmentierung belegte einen für Flavonoide typischen Retro-Diels-Alder-Zerfall, wobei der Basispeak mit m/e 153 auf die Dihydroxy-Substitution des A-Rings zurückzuführen war. Die Signale bei m/e 120 und m/e 91 bestätigten eine Monohydroxy-Substitution des B-Rings, wie es bei Naringenin (5,7,4'-Trihydroxy-flavanon) der Fall ist.

DC- und HPLC-Vergleiche von Substanz E mit authentischem Naringenin bestätigten das Ergebnis. Naringenin entsprach damit biosynthetisch dem Flavanonol Dihydrokämpferol, das kürzlich aus Früchten der violettblühenden Silybum-Varietät isoliert worden war (46).

Abb. 33: Strukturformel Naringenin



6.3. Apigenin und Chrysoeriol

Eine weitere, bislang nicht zugeordnete Bande in der DC der weißen Silybum-Varietät befand sich bei Verwendung von LM I und II oberhalb des Silandrins (Zone Nr. 5 in Abb. 6, S. 15). Im UV 254 als äußerst schwache Löschung sichtbar, fluoreszierte sie nach Detektion mit Naturstoff-PÄG-Reagenz schwach gelblich.

Nach Anreicherung über Säulenchromatographie isolierten wir diese als Flavon Z bezeichnete Zone auf übliche Weise durch präparative DC. Eine anschließende DC der isolierten Substanz zeigte, daß kein einheitliches Produkt vorlag und Verunreinigungen mit anderen Inhaltsstoffen auftraten. Außerdem ließ die DC vermuten, daß Flavon Z aus zwei sehr eng beieinanderliegenden Zonen bestand, wenn auch auf Grund der geringen Konzentration zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutige Aussage darüber gemacht werden konnte.

Die Reinisolierung von Flavon Z gelang durch präparative HPLC. Als günstig erwies sich hierfür die mobile Phase MeOH-H₂O 1 : 1 in Verbindung mit einer "reversed-phase"-Säule. Dabei wurde Flavon Z als Doppelpeak mit einer etwas kürzeren Retentionszeit als Silandrin eluiert. Für die Isolierung verwendeten wir ein säurefreies Fließmittel.

Auf diese Weise wurden 3 mg einer gelben Substanz gewonnen, die, wie eine DC im LM III zeigte, aus zwei Verbindungen bestand.

Wegen der geringen Substanzmenge war eine neue präparative DC nicht mehr möglich. Wir führten daher die Untersuchung mit dem Gemisch durch.

Das UV-Spektrum mit den Hauptmaxima bei 268 nm und 337 nm deutete auf das Vorliegen eines Flavon-Gemisches hin. Mehr

Informationen zur Strukturaufklärung lieferte ein Massenspektrum der Substanz. Bei dem Peak mit der höchsten registrierten Masse von m/e 300, der zugleich den Basispeak des Spektrums darstellte, mußte es sich um den Molekülpeak einer der beiden Komponenten (Z_1) handeln. Da das nächstniedrige Signal in ähnlicher Intensität bei m/e 270 erschien, sollte es sich bei diesem um den Molekülpeak der zweiten Komponente (Z_2) handeln. Die folgenden Signale ließen sich ohne Schwierigkeiten auf Grund der allgemein bekannten Fragmentierungsmuster bei Flavonoiden (27, 44) den Komponenten Z_1 und Z_2 zuordnen.

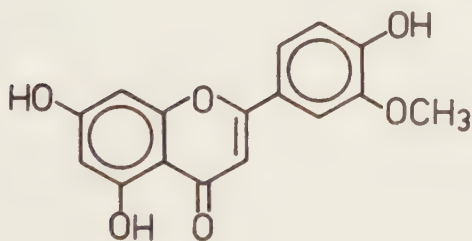
Somit war anzunehmen, daß es sich bei Z_1 um ein Flavon mit dem Molekulargewicht von 300 handelte. Da der unsubstituierte Flavonkörper ein Molekulargewicht von 222 besitzt, waren 78 Masseneinheiten auf die Substituenten zu verteilen. Nahm man unter Berücksichtigung der bekanntesten Substitutionsmuster das Vorliegen von Hydroxyl-, Methyl- oder Methoxy-Gruppen an, so konnte auf die Struktur eines Flavons geschlossen werden, das dreimal mit OH- und einmal mit CH_3O -Gruppen substituiert war.

Auf ähnliche Weise ließen sich bei Z_2 Schlüsse über Substitutionsgrad und -art ziehen. In diesem Molekül standen für die Substituenten 48 Masseneinheiten zur Verfügung. Damit konnte für die Komponente Z_2 die Struktur eine Trihydroxy-flavons angenommen werden.

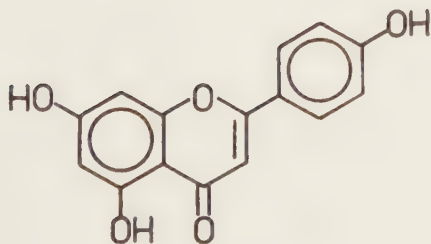
Die einfachsten Vertreter dieser Klasse stellen Apigenin (5,7,4'-Trihydroxy-flavon) sowie die Isomere Chrysoeriol (5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxy-flavon) und Diosmetin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxy-flavon) dar.

Vergleichende HPLC- und DC-Untersuchungen mit Referenzsubstanzen bewiesen, daß "Flavon Z" aus den Flavonen Chrysoeriol (Z_1) und Apigenin (Z_2) bestand.

Abb. 34: Strukturformeln der isolierten Verbindungen Chrysoeriol und Apigenin



CHRYSOERIOL



APIGENIN

7. Vergleichende HPLC-Untersuchung beider Silybum-Varietäten

Während in der violettblühenden Varietät von *Silybum marianum* die Diastereomerenpaare Silybin und Isosilybin neben Silydianin, Silychristin und Taxifolin als Hauptinhaltsstoffe vorkommen und sich auf Grund der Untersuchungen von TITTEL (21, 100) eindeutig zuordnen ließen, zeigte der Extrakt aus der weißen Varietät ein völlig anderes Chromatogrammbild (Abb. 35, S. 82/83) und bestätigte damit die unterschiedlichen Inhaltsstoffmuster beider *Silybum-marianum*-Rassen.

Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Vergleich mit den Retentionszeiten von Referenzsubstanzen und mit Hilfe simultan aufgenommenener UV-Spektren der Extraktkomponenten. Die Verwendung eines Acetonitril-Wasser-Gradientensystems als mobile Phase führte zu einer Grundlinientrennung der meisten Inhaltsstoffe. Die isomeren Verbindungen Flavon B₁ und Flavon B₂ wurden in diesem System nicht aufgetrennt und erschienen als einzelner Peak mit $k' = 8.27$. Silymonin wurde auf Grund derselben Retentionszeiten zusammen mit Flavon A als Peak mit $k' = 7.80$ registriert.

Für das Flavonolignan Silandrin, das bisher als einheitliche Substanz angesehen wurde, ließ sich zum erstenmal das Auftreten zweier Peaks beobachten. Die UV-Spektren der einzelnen Peaks bestätigten die enge strukturelle Beziehung zwischen beiden Komponenten. Nachdem dieses Flavonolignan auf Grund spektroskopischer und partialsynthetischer Arbeiten (5) der Isosilybin-Reihe (vgl. Fußnote S. 38) zugeordnet worden war und damit ein Regioisomerengemisch bezüglich der Substituenten am C- α und C- β ausgeschlossen werden konnte, läßt sich auch für Silandrin das Vorkommen als Diastereomerengemisch postulieren, wie es bereits für die homologen Verbindungen Isosilybin und Silybin beschrieben wurde (99).

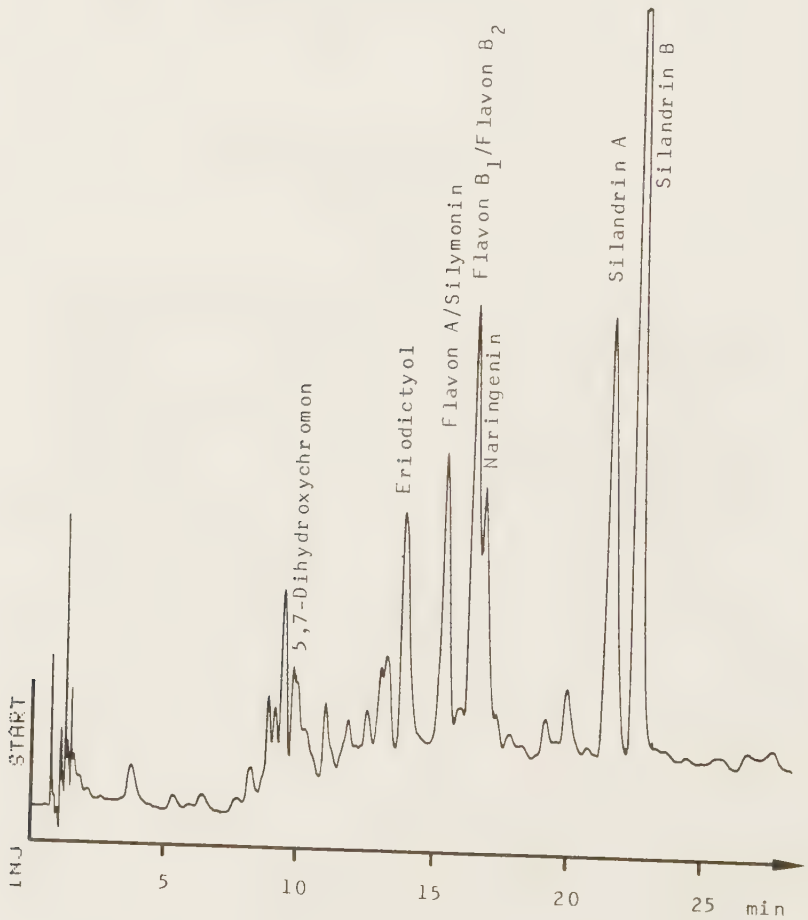
Mit Hilfe der HPLC ließ sich außerdem eine Gehaltsbestimmung der Inhaltsstoffe der weißblühenden Silybum-Varietät durchführen. Die Quantifizierung wurde nach der Methode des externen Standards durchgeführt. Die Integration der Peakflächen erfolgte elektronisch.

Tab. 9: Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Inhaltsstoffen der weißen Silybum-Varietät

	Gehalt %	k'
5,7-Dihydroxychromon	0.12	5.02
Eriodictyol	0.30	7.12
Silymonin/Flavon A	0.16	7.80
Flavon B ₁ /Flavon B ₂	0.27	8.27
Naringenin	0.13	8.53
Silandrín A	0.29	10.89
Silandrín B	0.52	10.91

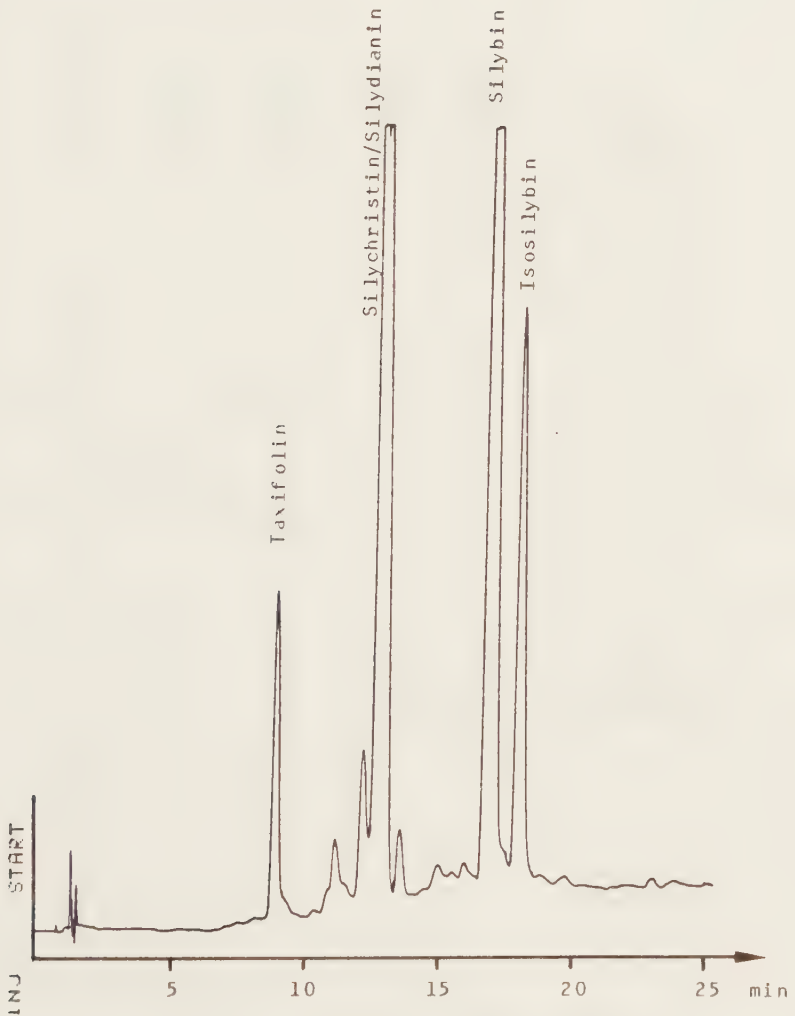
Abb. 35: HPLC-Chromatogramme der MeOH-Rohextrakte beider
Silybum-Varietäten

a) weißblühende Varietät



Gerät: Hewlett-Packard HP 1082 B mit Autosampler und
HP 1040 A Dioden Array Spektralphotometer
Trennparameter: siehe Exp. Teil 3.3.1. a)

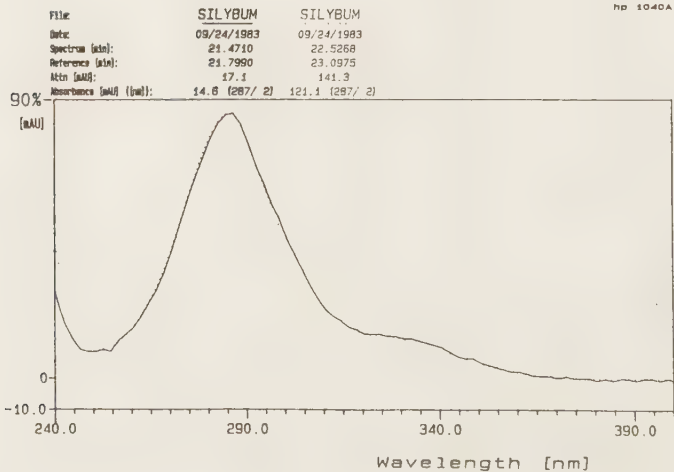
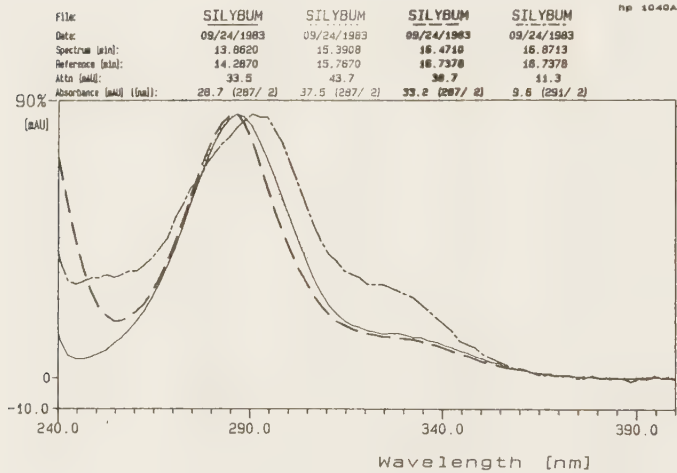
b) violetteblühende Varietät



Gerät: Hewlett-Packard HP 1082 B mit Autosampler und
HP 1040 A Dioden Array Spektralphotometer

Trennparameter: siehe Exp. Teil 3.3.1. a)

Abb. 36: Simultan aufgenommene UV-Spektren einzelner Peaks
im HPLC-Chromatogramm der weißen Silybum-Varietät



Teil II - Pharmakologisches Screening

1. Auswahl der Testmethoden

Da Lebererkrankungen sehr verschiedenartige Ursachen haben können und sich in mannigfachen Krankheitsbildern äußern - die Pathologie nennt nicht weniger als 20 Formen von Lebererkrankungen -, ist es nicht einfach, geeignete Tier- bzw. Versuchsmodelle zu finden, mit denen die Wirksamkeit eines Drogenextrakts oder einer isolierten Verbindung ermittelt werden kann. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Methoden.

Nach der ersten Methode wird ein in-vivo-Leberschaden durch Verabreichen von lebertoxischen Verbindungen wie z.B. CCl_4 und Galactosamin gesetzt und versucht, diesen prophylaktisch oder kurativ zu antagonisieren. Die Inhibierungsrate wird auf verschiedene Weise (Überlebensrate, Schlafzeitverlängerung, Enzymparameter) bestimmt.

Eine andere Methode bedient sich Zellfraktionen oder isolierter Hepatozyten und bestimmt den Einfluß eines leberaktiven oder antihepatotoxischen Prinzips auf bestimmte Enzyme (Polymerasen, Glutamat-Pyruvat-Transaminase).

Ein Nachteil vieler Schädigungsmodelle ist, daß sie den tatsächlichen Leberschäden in Genese und Verlaufsform oft nicht entsprechen. Bei den in-vitro-Modellen bleibt zudem die Pharmakokinetik unberücksichtigt.

Im folgenden sind einige Versuchsmodelle beschrieben, die bisher am häufigsten für das Screening verwendet wurden und von uns auch für orientierende Versuche eingesetzt wurden.

2. Allgemeine Testmethoden

2.1. In-vivo-Lebertest an CCl₄-geschädigten Ratten

In diesem Test wird je 5 Ratten die zu testende Substanz mit Hilfe einer Schlundsonde eingeführt. Nach einer Stunde wird ein Gemisch aus CCl₄ und flüssigem Paraffin verabreicht, um eine Leberschädigung zu induzieren. Eine nach 24 Stunden durchgeführte i.v. Hexobarbital-Injektion führt zur sofortigen Narkotisierung der Versuchstiere. Die Stärke der vorhandenen Leberschädigung drückt sich in einer verlängerten Schlafdauer der Tiere aus, da Hexobarbital durch Leberenzyme inaktiviert wird und deren Aktivität wiederum entsprechend dem Grad des Leberschadens herabgesetzt ist. Als Kontrolle dient je ein Kollektiv an Ratten, denen in einem Falle reines Paraffin und im anderen Falle nur das schädigende CCl₄-Paraffin-Gemisch per os eingeführt wurde. Vollständige oder teilweise Antagonisierung des Leberschadens drückt sich in einer Verkürzung der Schlafzeitverlängerung aus.

2.2. In-vitro-Test auf Leberschutzwirkung nach CCl₄- und Galactosamin-Schädigung⁺⁾

Das Prinzip dieses Tests beruht auf einer Schädigung kultivierter Hepatozyten durch CCl₄ oder Galactosamin. Dabei kommt es zu einer Freisetzung von Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), die per Autoanalyser bestimmt wird. Je nach hepatoprotektiver Potenz einer Substanz wird die GPT-Freisetzung mehr oder weniger stark gehemmt. Bezogen wird auf den mit 100 % angesetzten GPT-Gehalt der Kontrolle nach reiner Schädigung mit CCl₄ oder Galactosamin.

⁺⁾ Wir danken Herrn Prof.H.HIKINO, Sendai, Japan, für die Durchführung der Tests.

2.3. Stimulierung der Polymerasen A und B⁺

In diesem Testsystem wird der Einfluß verschiedener Substanzen auf die RNA-Synthese durch die DNA-abhängigen Polymerasen A und B bestimmt. Verwendet wird hierzu Tritium-markiertes UTP, das unter dem Einfluß der Polymerasen in die RNA eingebaut wird. Die Einbaurate von (³H)-UTP kann durch Messung der Radioaktivität bestimmt werden. Sie stellt ein Maß für die Proteinsynthese der Leber dar (47).

2.4. In-vivo-Test an Phalloidin- bzw. α -Amanitin-geschädigten Mäusen⁺⁺

In diesem Modell wird die protektive Wirkung von Substanzen auf eine durch Phalloidin bzw. α -Amanitin induzierte Leberschädigung untersucht. Durch Vergleich der Überlebensraten mit lebergeschädigten Kontrollgruppen ohne vorherige Applikation von Testsubstanzen kann bestimmt werden, ob und inwieweit eine Schutzwirkung besteht.

3. Bisherige Untersuchungen an Silybum-Wirkstoffen

Die Inhaltsstoffe von Silybum marianum zählen zu den am meisten untersuchten Lebertherapeutika. In zahlreichen Publikationen wurden Pharmakologie und klinische Anwendung beschrieben (47 - 51, 106).

⁺) Wir danken Herrn Prof.Dr.J.SONNENBICHLER, MPI Martinsried, für die Durchführung der Versuche.

⁺⁺) Wir danken Herrn Prof.Dr.G.VOGEL, Fa. Madaus, für die Durchführung der Versuche.

Das Flavonolignan Silybin bewies in einer Vielzahl von Testmodellen seine Wirksamkeit gegenüber Lebergiften. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß Silybin bei prophylaktischer Verabreichung eine Leberschädigung durch α -Amanitin und Phalloidin vollständig zu antagonisieren vermag (vgl. II.2.4.). Den Isomeren Silychristin und Silydianin kommt im pharmakologischen Experiment qualitativ die gleiche Wirkung zu (52).

Im in-vivo-Test mit CCl_4 -geschädigten Tieren (vgl. II.2.1.) wurde für Silybin eine Antagonisierung der Schlafdauerverlängerung um 59 % gemessen (51).

Untersuchungen von SONNENBICHLER (49, 50) zeigten, daß Silybin die RNA-Polymerase A stimuliert und somit zu einer verstärkten Synthese ribosomaler RNA führt (vgl. II.2.3.). Auf diese Weise wird die nach Galactosamin-Intoxikation verminderte Protein-Biosynthese durch Silybin wieder normalisiert (47).

Die aus der weißblühenden Silybum-Varietät stammenden Flavonolignane Silandrin und Silymonin sowie zwei HPLC-Fraktionen des von uns isolierten Isomerengemisches "Flavon G" (vgl. I.2.7.) zeigten im Konzentrationsbereich von 0.01 - 10 $\mu\text{g/ml}$ keinen Einfluß auf die Aktivität der Polymerasen A und B.

Die Verbindungen Silandrin und Silymonin waren außerdem im Phalloidin-Leberschädigungsmodell nach VOGEL (53) untersucht worden.

Bei Silandrin betrug die Überlebensrate innerhalb der mit 35 mg/kg vorbehandelten Gruppe im Beobachtungszeitraum von 24 Stunden ebenso 5 % wie bei der Kontrollgruppe (5).

Silymonin zeigte im Konzentrationsbereich von 50 - 200 mg/kg ebenfalls keinen signifikanten Einfluß auf die mit Phalloidin vorbehandelte Gruppe. Die Überlebensrate lag bei 22 % bzw. 30 % (50 mg/kg bzw. 200 mg/kg) und unterschied sich damit nur unwesentlich von der in der Kontrollgruppe.

Im α -Amanitin-Schädigungsmodell (52) war für Silymonin im Konzentrationsbereich von 50 - 200 mg/kg keine Antagonisierung der Leberschädigung zu beobachten. Die Überlebensrate betrug 10 % bzw. 40 % (50 mg/kg bzw. 200 mg/kg) und lag damit im Bereich der für die Kontrollgruppe festgestellten Werte.

4. Testung der Silybum-Wirkstoffe im Hepatozyten-Modell

Alle bisher bekannten oder im Rahmen dieser Arbeit isolierten Verbindungen aus der weißblühenden Silybum-Varietät mit Ausnahme von Apigenin und Chrysoeriol wurden auf ihren hepatoprotektiven Effekt hin am Hepatozyten-Modell nach HIKINO (vgl. II.2.2.) getestet. Zum Vergleich wurden die in der violettblühenden Varietät vorkommenden Flavonolignane Silybin, Silychristin und Silydianin sowie das Flavanol Taxifolin mituntersucht (Tab. 10, S. 90).

Die Tabelle zeigt, daß im CCl₄-Modell alle Flavonolignane dosisabhängig eine signifikante Inhibierung der GPT-Freisetzung bewirken und somit als potentiell leberschutzwirksam zu betrachten sind. Bemerkenswert ist, daß hier "Flavon G" in allen Konzentrationsstufen die GPT-Freisetzung stärker verhinderte als Silybin, dessen protektive Wirkung gegenüber Lebergiften in anderen Testmodellen (vgl. II.3.) bereits bewiesen wurde.

Im Galactosamin-Modell besitzen das Silydianin, das zu diesem homologe Silymonin und Eriodictyol bei einer Dosierung von 1,0 mg/ml mit Abstand die stärkste Hemmwirkung auf die GPT-Freisetzung.

Tab. 10: Wirkung auf CCl_4 - und GalN-induzierte Schädigung von Hepatozyten, ausgedrückt in % GPT-Aktivität

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT			
		CCl_4		GalN	
		IU/l	%	IU/l	%
Kontrolle	-	331±4	100	106±1	100
Silandrin	0.01	337±5	102	107±2	101
	0.1	285±8 ⁺	86	110±5	104
	1.0	71±4 ⁺⁺	21	60±1 ⁺⁺	57
Silymonin	0.01	338±8	102	108±3	102
	0.1	305±5	92	97±2	92
	1.0	142±3 ⁺⁺	43	14±2 ⁺⁺	13
Flavon G (Isomergemisch)	0.01	285±0 ⁺	86	124±3 ^x	117
	0.1	261±3 ⁺⁺	79	53±3 ⁺⁺	50
	1.0	79±1 ⁺⁺	24	112±5	106
Eriodictyol	0.01	341±8	103	108±2	102
	0.1	415±15 ^x	126	121±3 ^x	114
	1.0	428±5 ^{xx}	129	11±2 ⁺⁺	10
Naringenin	0.01	286±9	86	105±1	99
	0.1	305±6	92	39±1 ⁺⁺	37
	1.0	232±7 ⁺⁺	70	317±3 ^{xx}	299
5,7-Dihydroxychromon	0.01	285±5 ⁺	86	111±4	105
	0.1	296±6 ⁺	89	55±1 ⁺⁺	52
	1.0	255±0 ⁺⁺	77	117±5	110
Silybin	0.01	310±6	94	113±1	107
	0.1	309±2 ⁺	93	103±4	97
	1.0	102±1 ⁺⁺	31	82±2 ⁺⁺	77
Silydianin	0.01	334±1	101	78±2 ⁺⁺	74
	0.1	300±3 ⁺	91	107±4	101
	1.0	258±9 ⁺	78	13±0 ⁺⁺	12
Silychristin	0.01	345±2	104	109±5	103
	0.1	334±6	101	116±2	110
	1.0	226±2 ⁺⁺	68	85±3 ⁺	80
Taxifolin	0.01	297±9	90	101±2	95
	0.1	316±8	95	74±3 ⁺⁺	70
	1.0	315±10	95	60±2 ⁺⁺	57

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle bei n = 3:

- wirksam, $p < 0.01^+$ oder $p < 0.001^{++}$
- toxisch, $p < 0.01^x$ oder $p < 0.001^{xx}$

Da Naringenin im Galactosamin-Modell eine dosisabhängige Schädigung der Hepatozyten zu bewirken scheint und eine direkte Beeinflussung der Enzymaktivitäten durch die Testsubstanzen ausgeschlossen werden mußte, wurden zwei zusätzliche Testreihen durchgeführt.

In der ersten wurde geprüft, ob die zu testenden Verbindungen nicht selbst eine leberschädigende Wirkung besitzen. Dazu wurde die GPT-Aktivität gemessen, nachdem die Substanzen für 30 Stunden mit Hepatozyten ohne schädigenden Galactosamin-Zusatz inkubiert worden waren (Tab. 11).

Tab. 11: Einfluß der Testsubstanzen auf die GPT-Aktivität ohne vorherige Schädigung

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT-Aktivität IU/l
Kontrolle	-	41±2
Silandrin	0.01	40±3
	0.1	191±11 ^{xx}
	1.0	142±8 ^{xx}
Silymonin	0.01	46±3
	0.1	182±14 ^{xx}
	1.0	24±2
Flavon G (Isomerengemisch)	0.01	39±3
	0.1	38±2
	1.0	134±3 ^{xx}
Naringenin	0.01	38±2
	0.1	31±3
	1.0	230±2 ^{xx}
5,7-Dihydroxychromon	0.01	37±1
	0.1	39±2
	1.0	173±8 ^{xx}
Silybin	0.01	47±4
	0.1	221±4 ^{xx}
	1.0	151±6 ^{xx}
Silychristin	0.01	54±5
	0.1	52±3
	1.0	177±4 ^{xx}

Wie aus Tab. 11 hervorgeht, ist vor allem in der Dosierung 1.0 mg/ml allgemein eine Steigerung der Transaminaseaktivität zu beobachten. Dieser Effekt läßt sich durch die lange Inkubationszeit von 30 Stunden erklären, die sich offenbar besonders in höheren Konzentrationen auswirkt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der mögliche Einfluß der zu testenden Verbindungen auf die Transaminaseaktivität untersucht (Tab.12).

Tab. 12: Wirkung der getesteten Substanzen auf die GPT-Aktivität

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT-Aktivität	
		IU/l	%
Kontrolle	-	313	100
Silandrin	1.0	251	80
Silymonin	1.0	242	77
Flavon G (Isomerengemisch)	1.0	180	58
Naringenin	1.0	298	95
Silybin	1.0	244	78
Silychristin	1.0	251	80

Die Tabelle 12 zeigt, daß der Einfluß auf die Enzymaktivität praktisch zu vernachlässigen ist, d.h. die Inhibierung des GPT-Austritts infolge von Zellzerstörung erfaßt wird. Allein "Flavon G" weist eine stärkere Enzymhemmung auf. Damit ist jedoch keine Erklärung für die signifikante Verringerung der GPT-Aktivität im CCl_4 -Modell auf 24 % des ursprünglichen Wertes gegeben (vgl. Tab. 10, S. 90).

Vergleicht man die Ergebnisse des Hepatozytentests mit denen der anderen Testverfahren, so wird deutlich, daß die Ergebnisse der einzelnen Tests im großen und ganzen gut korrelieren. Die Flavonolignane Silybin, Silychristin und Silydianin zeigen sowohl im Hepatozytenmodell als auch im Phalloidin- bzw. α -Amanitin-System eine signifikante Schutzwirkung vor Leberschädigung unterschiedlicher Genese.

Aus diesem Grunde wurde der Hepatozytentest, der relativ einfach durchzuführen war und nur wenig Substanz (5 mg) benötigte, als orientierendes Testmodell für das Screening von potentiell leberschutzwirksamen Drogen eingesetzt.

5. Drogenscreening

5.1. Übersicht

In der Volksmedizin Asiens und Südamerikas werden zahlreiche Pflanzen zur Behandlung von Lebererkrankungen verwendet. Diese Drogen sollen zum Teil kurativ auf bereits manifeste Erkrankungen des Organs einwirken, zum Teil protektiv einer Leberschädigung entgegenwirken.

Nachstehend sind die Drogen aufgelistet, die am häufigsten Bestandteil von Arzneipräparationen sind.

Tab. 13: Drogen mit zugeschriebener Leberwirksamkeit

Stammpflanze	Familie	Literatur
<i>Butea monosperma</i>	Leguminosae	(54, 55)
<i>Eclipta alba</i>	Asteraceae	(56-61, 102-104)
<i>Wedelia calendulacea</i>	Asteraceae	(56, 62)
<i>Capparis spinosa</i>	Capparidaceae	(63, 64)
<i>Tamarix gallica</i>	Tamaricaceae	(63)
<i>Berberis aristata</i>	Berberidaceae	(63, 64)
<i>Curcuma zedoaria</i>	Zingiberaceae	(65)
<i>Artemisia capillaris</i>	Asteraceae	(66, 92)
<i>Bupleurum falcatum</i>	Apiaceae	(67)
<i>Wikstroemia viridiflora</i>	Thymelaeaceae	(68)
<i>Lophophytum leandri</i> (Flor de Piedra)	Balanophoraceae	(69-71, 88, 101)
<i>Picrorhiza kurroa</i>	Scrophulariaceae	(72-76, 107, 108)
<i>Phyllanthus niruri</i>	Euphorbiaceae	(77-80, 109-119)

5.2. Butea monosperma

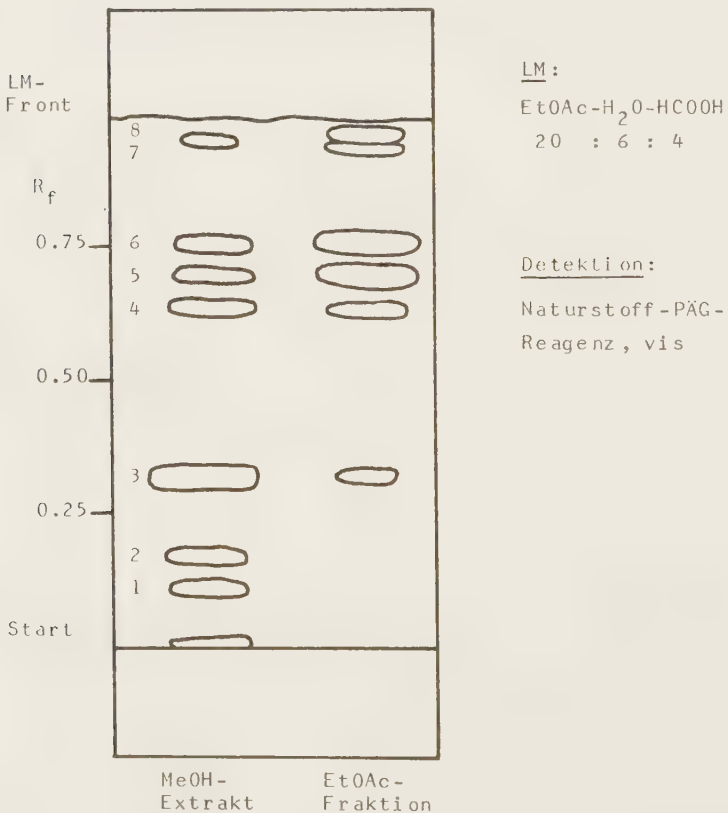
Butea monosperma (Lam.) Kuntze (= *Butea frondosa* Koen. ex Roxb.), eine in Ostindien und Burma beheimatete und zu den Leguminosen zählende Pflanze, enthält laut Literatur die in Tab. 14 aufgelisteten Verbindungen.

Tab. 14: Bisher bekannte Inhaltsstoffe von *Butea monosperma*

Lit.	Verbindung	Struktur
(27)	3,7,4'-Trihydroxy- flavon	$R=R'=H$
(27)	Fisetin	$R=H, R'=OH$
(27)	Robinetin	$R=R'=OH$
(55)	Butin	$R=R'=H$
(55)	Butrin	$R=R'=Glu$
(55)	Isocoreopsin	$R=Glu, R'=H$
(55)	Isomonospermosid	$R=H, R'=Glu$
(55)	Butein	$R=R'=H$
(55)	Isobutrin	$R=R'=Glu$
(55)	Coreopsin	$R=Glu, R'=H$
(55)	Monospermosid	$R=H, R'=Glu$
(55)	Palasitrin	$R=R'=Glu$
(55)	Sulphurein	$R=Glu, R'=H$

Um zu klären, ob diese Flavonoide oder andere Inhaltsstoffe für diese Wirkung verantwortlich sind, stellten wir durch MeOH-Extraktion und Ethylacetat-Ausschüttelung eine Flavonoidfraktion her, die laut DC aus mindestens 6 Verbindungen bestand (Abb. 37).

Abb. 37: DC-Skizze des MeOH-Extrakts und der EtOAc-Fraktion



Der MeOH-Gesamtextrakt und die Substanz aus der EtOAc-Ausschüttelung wurden im in-vivo-CCl₄-Modell auf Leberschutzwirkung getestet (vgl. II.2.1.). Sowohl der Gesamtextrakt als auch die Ethylacetat-Ausschüttelung führten zu einer verkürzten Schlafdauer der Tiere (Tab. 15).

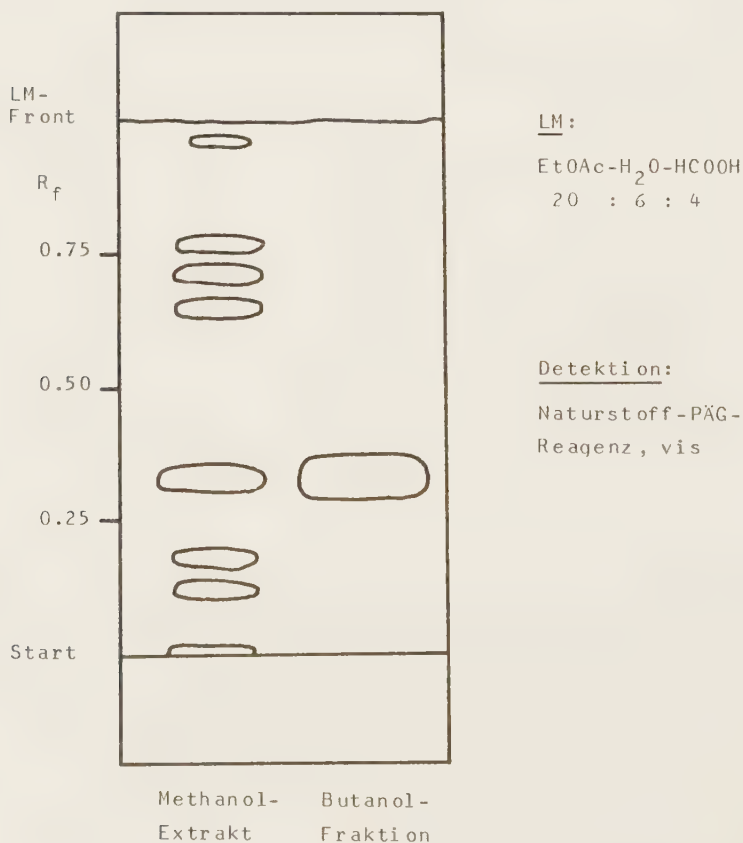
Tab. 15: Antagonisierung der Schlafzeitverlängerung durch Extrakte aus *Butea monosperma*

Substanz	Durchschnittliche Schlafdauer	Antagon. Anteil der Schlafzeitverlängerung
Kontrolle 1 (reines Paraffin)	28 min	-
Kontrolle 2 (CCl ₄ /Paraffin)	79 min	0 %
MeOH-Extrakt	44 min	68.6 %
EtOAc-Fraktion	61 min	35.3 %

Aus der Tabelle geht hervor, daß der MeOH-Gesamtextrakt in diesem Testsystem eine stärkere Wirkung zeigt (68.6 % Antagonisierung) als die Ethylacetat-Ausschüttelung (35.3 % Antagonisierung). Damit dürfte das Wirkprinzip mehr im Bereich der polarerer Verbindungen lokalisiert sein.

In einem weiteren Schritt wurde die zurückbleibende Wasserphase nach EtOAc-Ausschüttelung erschöpfend mit n-Butanol ausgeschüttelt. Auf diese Weise erhielten wir 2.5 g eines gelben Pulvers ($\hat{=}$ 25 % des MeOH-Extrakts), das in der DC-Analyse eine intensive Zone bei R_f 0.3 ergab (Abb. 39).

Abb. 38: DC-Vergleich MeOH-Extrakt - Butanol-Ausschüttelung



Im Hepatozyten-Test (vgl. II.2.2.) übte diese Fraktion sowohl im CCl_4 - als auch im Galactosamin-Modell eine signifikante Schutzwirkung gegenüber beiden Noxen aus. Silybin diente in derselben Konzentration als Referenzsubstanz.

Tab. 16: Wirkung auf CCl_4 - und GalN-induzierte Schädigung von Rattenhepatozyten, ausgedrückt in % GPT-Aktivität

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT (%)	
		CCl_4	GalN
Kontrolle	-	100±1	100±2
Butea-Butanol- Ausschüttelung	1.0	54±4 ⁺⁺	62±0 ⁺⁺
Silybin	1.0	31 ⁺⁺	77 ⁺⁺

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle:

- wirksam, $p < 0.01^+$ oder $p < 0.001^{++}$

Um zu prüfen, ob neben einer hepatoprotektiven Wirkung noch eine Stimulierung der RNA-Synthese wie bei Silybin vorliegt, wurde die Butanol-fraktion im Testsystem mit isolierten Polymerasen getestet (vgl. II.2.3.).

Im Test mit Polymerase A war ein starker Stimulierungseffekt auf die rRNA-Synthese zu beobachten (s. Abb. 41, S. 107).

Nun wurde versucht, diese Wirkungen bestimmten Verbindungen der BuOH-Fraktion zuzuordnen.

Zu einer ersten Charakterisierung diente der Farbstest nach SHINODA (vgl. I.2.2.). Die Substanz aus der BuOH-Ausschüttelung ergab eine rotbraune Verfärbung der ursprünglich gelben Lösung. Da weder Chalkone noch Aurone unter diesen Bedingungen eine Farbreaktion zeigen (35), war mit dem Vorliegen eines Flavanons oder Flavanonols zu rechnen.

Das Hauptmaximum im UV-Spektrum derselben Substanz bei 370 nm lag in einem für die Bande I von Chalkonen und Auronen typischen Bereich (16). Ein zweites Maximum bei 264 nm tritt sowohl bei Flavanonen als auch bei Flavonolen, Chalkonen und Auronen auf. Allerdings deutete die relativ hohe Extinktion eher auf das Vorliegen eines Flavanons.

Die bisherigen Ergebnisse sprachen somit dafür, daß die pharmakologisch wirksame BuOH-Fraktion aus einem Gemisch aus einem Flavanon und einem Chalkon oder Auron bestand.

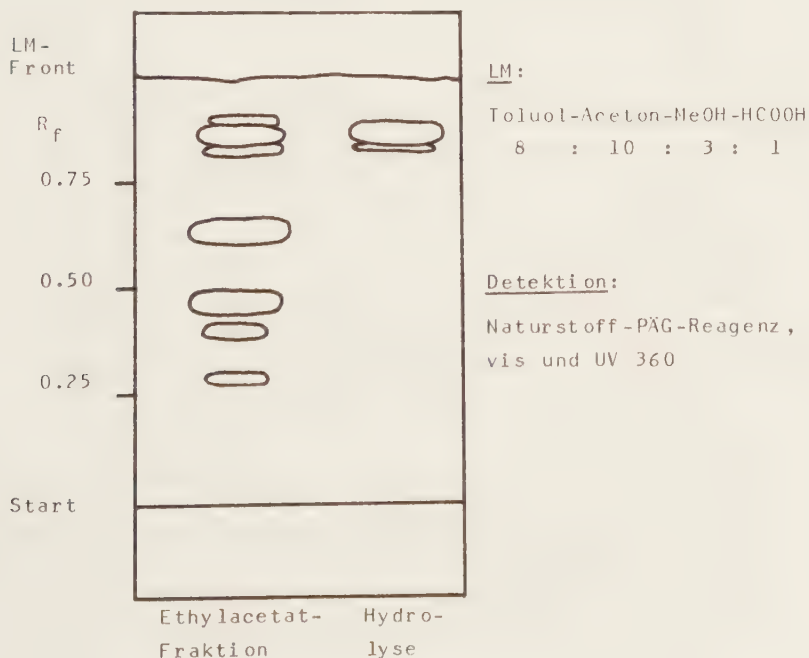
Zur Unterscheidung zwischen einem hydroxylierten Auron und Chalkon kann man deren stark unterschiedliche Maxima nach Peracetylierung heranziehen (35). Zu diesem Zweck acetylierten wir 100 mg der Butanol-Ausschüttelung auf die übliche Weise bei Raumtemperatur und nahmen dann erneut ein UV-Spektrum auf. Beim Vorliegen eines nun vollständig acetylierten Polyhydroxy-Aurons müßte das Spektrum dem von Auron selbst stark ähneln und somit ein Maximum bei 379 nm aufweisen. Acetate von Polyhydroxy-Chalkonen absorbieren dagegen bei einer deutlich niedrigeren Wellenlänge um 310 nm.

Der ermittelte Wert von 308 nm bewies, daß ein peracetyliertes Chalkon und kein Auron vorliegen mußte.

Da nach Hydrolyse nur noch eine Zone an der Laufmittelfront nachzuweisen war, mußte ursprünglich ein Glykosid vorgelegen haben.

Die Verwendung des lipophileren Fließmittels Toluol-Aceton-MeOH-HCOOH 8 : 10 : 3 : 1 bestätigte dieses Ergebnis und zeigte, daß das Hydrolyseprodukt in erster Linie aus einer Verbindung bestand. Die bei R_f 0.8 liegende, nach Detektion mit Naturstoff-PÄG sich violett verfärbende Substanz war mit einer entsprechenden Zone der EtOAc-Ausschüttelung identisch (Abb. 39).

Abb. 39: DC-Vergleich EtOAc-Fraktion - Hydrolyse



Ein Vergleich des UV-Spektrums des Hydrolyseprodukts mit Literaturangaben (35) für das Chalkon-Aglycon Butein und dessen isomeres Flavanon Butin ergab völlige Übereinstimmung der $\lambda_{\max}$ -Werte.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die aus der Butanol-Ausschüttelung stammende Substanz nach BRINACOMBE permethyliert (81) und davon ein Massenspektrum aufgenommen. Unter diesen Bedingungen erfolgt Permethylierung unter gleichzeitiger Ringöffnung des Flavanons zum Chalkon (82).

Tab. 17: MS-Daten der permethylierten BuOH-Fraktion

m/e (rel. Int. %)	Zuordnung
736 (<1)	M ⁺
518 (9)	Aglycon + H + Glucose
300 (41)	Aglycon + 2H
218 (70)	Glucose
187 (79)	"
155 (27)	"
111 (71)	"
101 (100)	"
71 (61)	"

Das Massenspektrum zeigte das bekannte Fragmentierungsmuster für di-substituierte Chalkone vom Typ des Isobuttrins, wobei nach der Signalsequenz ab m/e 218 als Zucker nur Hexosen in Frage kamen (82).

Nach dem MS sollte ein Diglykosid vorliegen, da andernfalls die Fragmente m/e 518 und m/e 300 nicht erklärbar gewesen wären. Im Falle eines Monoglykosids hätte die Fragmentierung Peaks bei m/e 532 und m/e 314 aufweisen müssen.

Ein ^1H -NMR-Spektrum des Gemisches aus der ursprünglichen BuOH-Fraktion ergab im Bereich der aromatischen und glykosidischen Protonen ein Dublett bei 8.25 ppm mit $J = 9 \text{ Hz}$, das sich dem H-6' eines Chalkons zuordnen ließ. Vom Flavanon-Anteil war nur das Signal für H-2 bei 5.50 ppm zu identifizieren. Aus den Intensitäten der Signale konnte jedoch auf ein etwa äquimolar vorliegendes Gemisch von Chalkon und Flavanon geschlossen werden.

Die Integration bestätigte die Substitution mit je zwei Zuckern.

Aus diesen orientierenden Untersuchungen geht hervor, daß

- die pharmakologische Wirkung des Butea-Extrakts vermutlich ganz oder größtenteils auf Flavonoid-Glykosidverbindungen zurückzuführen ist, und
- das aus der Butanol-Ausschüttelung erhaltene Glykosidgemisch, das auf der DC als intensive Zone im unteren R_f -Bereich nachweisbar ist (Abb. 37, Zone Nr. 3), aus dem Flavanon-diglucosid Butrin und dem hiermit isomeren Chalkon-diglucosid Isobutrin besteht.

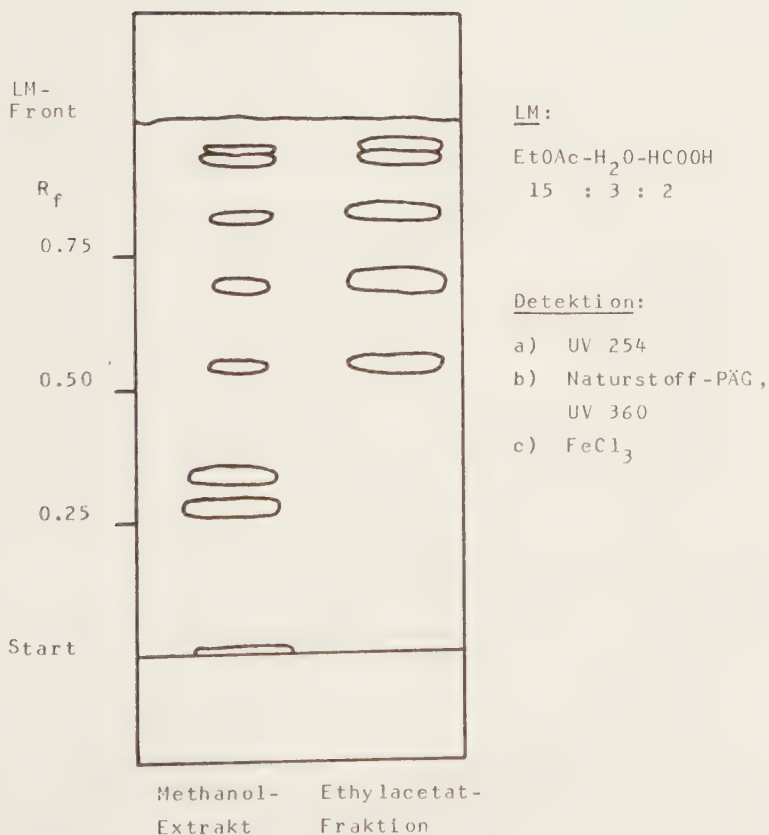
5.3. Eclipta alba

Die Gattung *Eclipta* aus der Familie der Asteraceen kommt in den tropischen wie subtropischen Regionen der Erde vor. Die einzige in Indien heimische Art, *Eclipta alba* Hassk., wird dort in der Volksmedizin zur Behandlung von Leber- und Milz-erkrankungen verwendet (56, 64).

1978 berichteten KHIN u. Mitarb. (61) über die protektive Wirkung eines Extrakts aus *Eclipta alba* gegenüber CCl_4 -induzierter Leberschädigung bei Meerschweinchen. Durch Bestimmung von Serumtransaminasen, Mortalitätsrate und histologische Studien konnte gezeigt werden, daß die mit *Eclipta* vorbehandelten Tiere signifikant bessere Ergebnisse aufwiesen als eine nicht vorbehandelte Kontrollgruppe.

Zur Lokalisierung des Wirkprinzips stellten wir aus 500 g getrockneten oberirdischen Bestandteilen der Droge durch Soxhlet-Extraktion einen MeOH-Gesamtextrakt her. Dieser wurde von Chlorophyll und Ballaststoffen befreit und mit EtOAc gegen Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten EtOAc-Phasen ergaben 3 g eines hellgrün gefärbten Pulvers.

Abb. 40: DC-Vergleich MeOH-Gesamtextrakt - EtOAc-Ausschüttelung



Die pharmakologischen Teste wurden mit der EtOAc-Fraktion durchgeführt.

Im in-vitro-Modell (siehe II.2.2.) mit CCl_4 - oder GalN-geschädigten Rattenhepatozyten wurde die stärkste Verringerung der Transaminasenwerte unter allen von uns getesteten Substanzen und Extrakten erreicht (Tab. 18).

Tab. 18: Wirkung auf CCl_4 - und GalN-induzierte Schädigung von Hepatozyten, ausgedrückt in % GPT-Aktivität

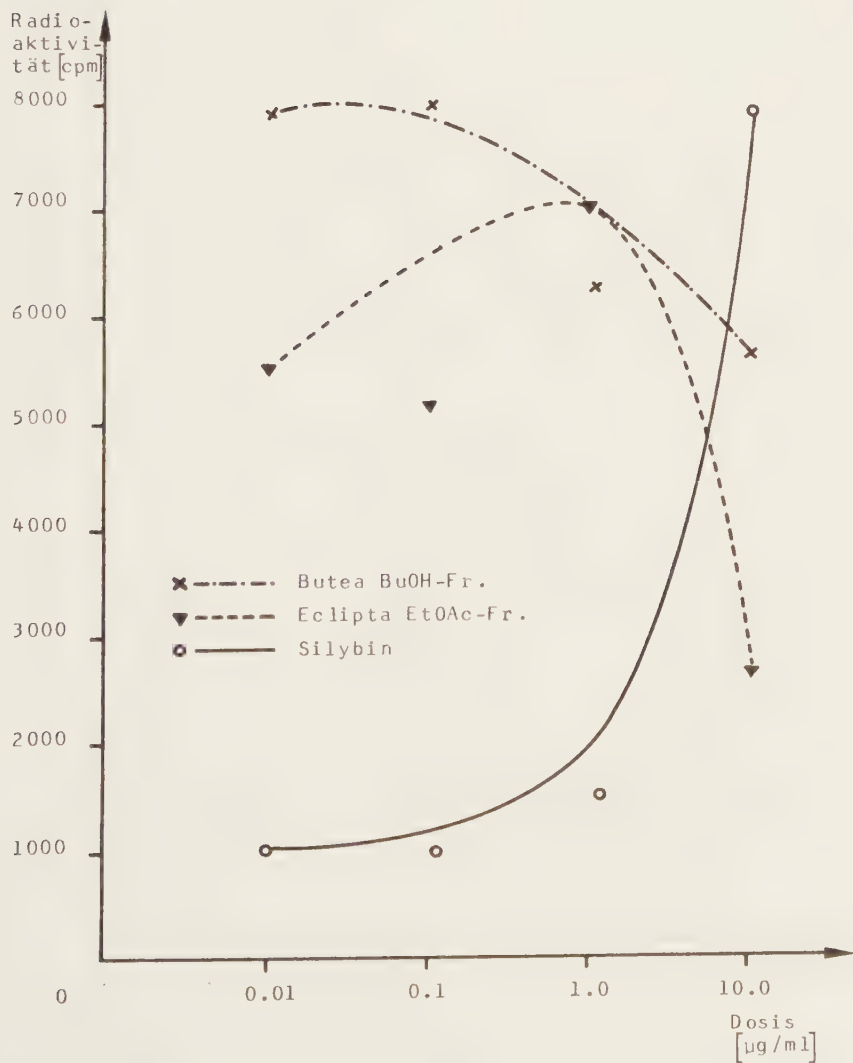
Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT (%)	
		CCl_4	GalN
Kontrolle	-	100±1	100±2
Eclipta EtOAc- Ausschüttelung	1.0	11±1 ⁺⁺	6±1 ⁺⁺
Silybin	1.0	31 ⁺⁺	77 ⁺⁺

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle:

- wirksam, $p < 0.01^+$ oder $p < 0.001^{++}$

Ebenfalls positiv fiel der Test auf Stimulierung der RNA-Synthese (siehe II.2.3.) aus. Im Modell mit isolierter Polymerase A war ein starker Stimulierungseffekt der EtOAc-Fraktion zu verzeichnen.

Abb. 41: Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Testsubstanzen auf den (^3H)-UTP-Einbau in die RNA



Frühere Untersuchungen der Droge hatten zur Isolierung und Strukturaufklärung von Verbindungen der unterschiedlichsten Substanzklassen geführt.

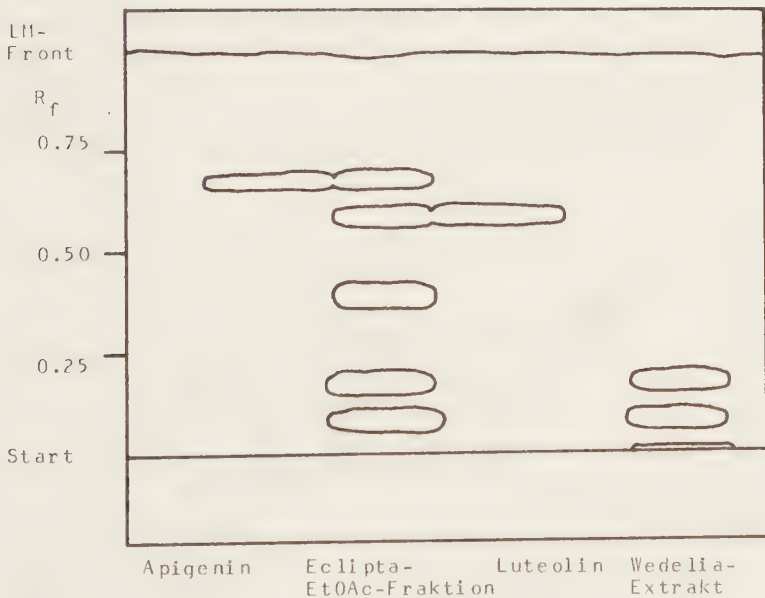
Im einzelnen sind folgende Verbindungen in *Eclipta alba* nachgewiesen worden:

Tab. 19: Bisher bekannte Inhaltsstoffe von *Eclipta alba*

Verbindung	Literatur
Wedelolacton	(56, 59, 62)
Demethylwedelolacton	(56, 57)
Demethylwedelolacton-glucosid	(56, 57)
Apigenin	(60)
Apigenin-7-glucosid	(60)
Luteolin	(60)
Luteolin-7-glucosid	(59, 60)
Thiophen-Derivate	(56)
Polyacetylene	(56, 85, 86)
Sterine	(56, 59, 60)
Polypeptide	(56)
Triterpene	(59)
Nicotin	(83, 84)

Die DC der EtOAc-Fraktion ergab im Fließmittel EtOAc-H₂O-HCOOH 15 : 3 : 2 nach Detektion im UV 254 mehrere Zonen im oberen R_f-Bereich. Eine Optimierung der Trennung gelang durch das Laufmittel Toluol-Aceton-HCOOH im Verhältnis 11 : 6 : 1. Hierbei kam es zur Auftrennung des Extrakts in fünf Zonen, die sich mit FeCl₃-Lösung grün anfärbten und auch mit Naturstoff-PÄG-Reagenz über Fluoreszenzen im UV 360 detektiert werden konnten (Abb. 42).

Abb. 42: Zuordnung der DC-Zonen der EtOAc-Fraktion



LM:

Toluol-Aceton-HCOOH

11 : 6 : 1

Detektion:

a) UV 254

b) Naturstoff-PÄG

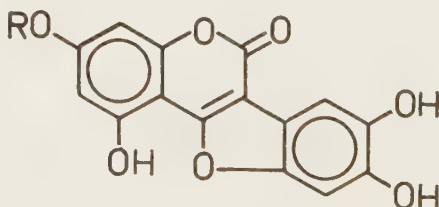
c) FeCl₃

Durch Co-Chromatographie mit authentischem Apigenin und Luteolin ließen sich zwei Zonen zuordnen.

Daß das Gemisch auch Verbindungen mit Lactonstruktur enthielt, war aus einer starken ausgeprägten Bande bei 1710 cm^{-1} im IR-Spektrum der EtOAc-Fraktion erkennbar. Möglicherweise war Wedelolacton (Abb. 43) oder eine verwandte Verbindung Bestandteil der Fraktion, da im Unterschied zu den γ -Chromonen bei dieser Wellenlänge die Absorption für die Carbonylgruppe der Coumestane zu erwarten ist (27).

Dafür sprach auch das teilweise identische dünnschichtchromatographische Verhalten eines Extrakts aus Wedelia calendulea (vgl. II.5.4.) mit dem des Eclipta-Extrakts (Abb. 42, S. 109). Daß zumindest Wedelolacton in beiden Arten vorkommt, ist seit den Untersuchungen von GOVINDACHARI u. Mitarb. bekannt (62, 87). Für eine definitive Zuordnung der DC-Banden und die endgültige Aufklärung des leberschutzwirksamen Prinzips sind jedoch weitergehende Arbeiten notwendig.

Abb. 43: Strukturformel von Wedelolacton



Wedelolacton

Demethylwedelolacton

Demethylwedelolacton-glucosid

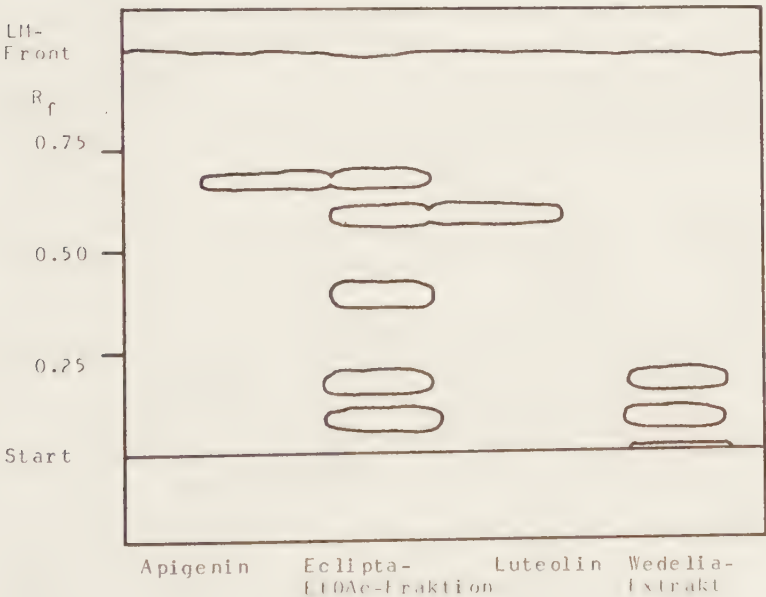
R = CH₃

R = H

R = Glucose

Die DC der EtOAc-Fraktion ergab im Fließmittel EtOAc-H₂O-HCOOH 15 : 3 : 2 nach Detektion im UV 254 mehrere Zonen im oberen R_f-Bereich. Eine Optimierung der Trennung gelang durch das Laufmittel Toluol-Aceton-HCOOH im Verhältnis 11 : 6 : 1. Hierbei kam es zur Auftrennung des Extrakts in fünf Zonen, die sich mit FeCl₃-Lösung grün anfärbten und auch mit Naturstoff-PÄG-Reagenz über Fluoreszenzen im UV 360 detektiert werden konnten (Abb. 42).

Abb. 42: Zuordnung der DC-Zonen der EtOAc-Fraktion



LM:

Toluol-Aceton-HCOOH

11 : 6 : 1

Detektion:

a) UV 254

b) Naturstoff-PÄG

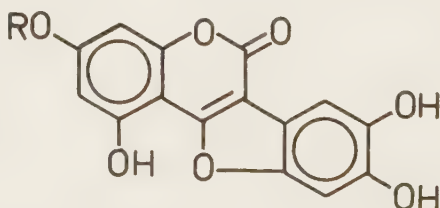
c) FeCl₃

Durch Co-Chromatographie mit authentischem Apigenin und Luteolin ließen sich zwei Zonen zuordnen.

Daß das Gemisch auch Verbindungen mit Lactonstruktur enthielt, war aus einer starken ausgeprägten Bande bei 1710 cm^{-1} im IR-Spektrum der EtOAc-Fraktion erkennbar. Möglicherweise war Wedelolacton (Abb. 43) oder eine verwandte Verbindung Bestandteil der Fraktion, da im Unterschied zu den γ -Chromonen bei dieser Wellenlänge die Absorption für die Carbonylgruppe der Coumestane zu erwarten ist (27).

Dafür sprach auch das teilweise identische dünnschichtchromatographische Verhalten eines Extrakts aus Wedelia calendulea (vgl. II.5.4.) mit dem des Eclipta-Extrakts (Abb. 42, S. 109). Daß zumindest Wedelolacton in beiden Arten vorkommt, ist seit den Untersuchungen von GOVINDACHARI u. Mitarb. bekannt (62, 87). Für eine definitive Zuordnung der DC-Banden und die endgültige Aufklärung des leberschutzwirksamen Prinzips sind jedoch weitergehende Arbeiten notwendig.

Abb. 43: Strukturformel von Wedelolacton



Wedelolacton

R = CH₃

Demethylwedelolacton

R = H

Demethylwedelolacton-glucosid

R = Glucose

5.4. Wedelia calendulacea

Wedelia calendulacea Less. ist eine in Südindien verbreitete Asteracee. In der Volksmedizin wird sie wie Eclipta alba zur Behandlung von Lebererkrankungen eingesetzt (56).

1956 isolierten GOVINDACHARI u. Mitarb. (62) daraus das Wedelolacton (s. Abb. 43, S. 110) als ersten Vertreter einer neuen Klasse komplex aufgebauter Cumarine.

Aus 0.5 kg getrockneten Blättern von Wedelia calendulacea wurde entsprechend den Angaben von GOVINDACHARI (62) ein Gesamtextrakt hergestellt und daraus eine Substanz isoliert, die auf der DC in zwei Zonen aufgetrennt wird (s. Abb. 42, S. 109). Diese besitzen dieselben R_f -Werte wie zwei Hauptzonen der Eclipta-EtOAc-Fraktion.

Das IR-Spektrum der isolierten Substanz weist wie die Eclipta-Fraktion (vgl. II.5.3.) eine Carbonyl-Bande bei 1710 cm^{-1} auf, die für das Vorliegen von Wedelolacton oder einer ähnlichen Verbindung spricht.

Die isolierte Substanz aus Wedelia calendulacea zeigte im Hepatozyten-Modell (s. II.2.2.) folgende Wirkung:

Tab. 20: Wirkung auf CCl_4 - und GalN-induzierte Schädigung von Hepatozyten, ausgedrückt in % GPT-Aktivität

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT (%)	
		CCl_4	GalN
Kontrolle	-	100 ± 1	100 ± 2
Wedelia-Substanz	1.0	$48 \pm 2^{++}$	106 ± 4
Silybin	1.0	31^{++}	77^{++}

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle:

- wirksam, $p < 0.01^+$ oder $p < 0.001^{++}$

5.5. Lophophytum leandri (= Flor de Piedra)

Lophophytum leandri Eichl. (= Flor de Piedra, Steinblüte) ist ein in den tropischen Wäldern Südamerikas vorkommender chlorophyllfreier Schmarotzer. In der Pflanze kommen neben Jod, Brom und Eisen Wachse sowie Gerb- und Bitterstoffe vor (70). Außerdem enthält die Pflanze größere Mengen flavonoider Verbindungen (Tab. 21).

Tab. 21: Bisher isolierte Flavonoidverbindungen aus Lophophytum leandri

Verbindung	Literatur
Eriodictyol	(69, 71)
Eriodictyol-glucosid	(71)
Naringenin	(69)
Naringenin-glucosid	(71)
Taxifolin	(71)
Epicatechin	(71)
Epicatechin-glucosid	(71)
Quercetin	(69)
Quercetin-glucosid	(71)
Procyanidine	(71)

Aus 400 g Droge wurden durch Extraktion mit Aceton 15 g Gesamtextrakt gewonnen. Durch Ausschütteln mit Diethylether und n-Butanol ließ sich dieser in eine lipophile und eine hydrophile Fraktion auftrennen.

Der Gesamtextrakt wie auch die beiden Fraktionen wurden im Polymerasen-Modell auf Stimulierung der RNA-Synthese getestet (siehe II.2.3.). Im Konzentrationsbereich von 0.01 - 10 µg/ml war kein Einfluß auf die Aktivität der Polymerasen A und B festzustellen.

Wie Tab. 22 zeigt, war im Hepatozyten-Test (s. II.2.2.) beim GalN-Modell eine deutliche Inhibierung der GPT-Freisetzung zu erkennen, während im Test mit CCl₄ als schädigendem Agens der Inhibierungseffekt weniger stark ausgeprägt war.

Tab. 22: Wirkung auf CCl₄- und GalN-induzierte Schädigung von Hepatozyten, ausgedrückt in % GPT-Aktivität

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT (%)	
		CCl ₄	GalN
Kontrolle	-	100±2	100±4
Lophophytum-Extrakt	1.0	92±0 ⁺	76±3 ⁺⁺
Silybin	1.0	33 ⁺⁺	77 ⁺⁺

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle:

-- wirksam, p < 0.01⁺ oder p < 0.001⁺⁺

5.6. Picrorhiza kurroa

Picrorhiza kurroa Royle ex Benth. wächst in der Himalaya-region in Höhen zwischen 3000 und 5000 m.

Folgende Verbindungen sind bisher aus den Wurzeln der Pflanze isoliert worden (Tab. 23):

Tab. 23: Inhaltsstoffe von *Picrorhiza kurroa*

Verbindung	Lit.
Kutkin (Gemisch aus Picrosid I und Kutkosid)	(72, 107)
Kurrin	(107)
Vanillinsäure	(107)
Kutkiol	(107)
Kutkisterol	(107)
Picrosid I (6'-Cinnamoyl-catalpol)	(73, 75)
Picrosid II (6-Vanilloyl-catalpol)	(74)
Kutkosid (10-Vanilloyl-catalpol)	(75)
6'-(4-Hydroxy-3-methoxycinnamoyl)-catalpol	(108)
Apocynin	(76)

Aus 20 g Droge wurde ein MeOH-Gesamtextrakt hergestellt und im Hepatozyten-Test (s. II.2.2.) auf Leberwirksamkeit hin untersucht. Wie aus Tab. 24 zu entnehmen ist, zeigte sich in keinem der beiden Schädigungsmodelle eine ausgeprägte Inhibierung der GPT-Aktivität.

Tab. 24: Wirkung auf CCl_4 - und GalN-induzierte Schädigung von Hepatozyten, ausgedrückt in % GPT-Aktivität

Substanz	Dosis (mg/ml)	GPT (%)	
		CCl_4	GalN
Kontrolle	-	100±2	100±5
Picrorhiza-Extrakt	1.0	92±3	129±2
Picrosid I	1.0	92±1 ⁺	111±2
Picrosid II	1.0	96±3	78±1 ⁺
Silybin	1.0	33 ⁺⁺	77 ⁺⁺

Signifikante Unterschiede zur Kontrolle:

- wirksam, $p < 0.01^+$ oder $p < 0.001^{++}$

Dieses Ergebnis deckt sich mit den Untersuchungen von HIKINO (90), der für Picrosid I keine Wirksamkeit im Hepatozyten-Test feststellen konnte.

Während Picrosid II im CCl_4 -Modell ebenfalls keine Wirkung zeigte, war im GalN-Test eine deutliche Verringerung der GPT-Aktivität zu beobachten.

Die übrigen in Tab. 12 aufgelisteten Drogen waren nicht Gegenstand unserer Untersuchungen.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Aus den Früchten der weißblühenden Varietät von *Silybum marianum* wurden durch Kombination verschiedener chromatographischer Methoden (Säulenchromatographie, präp. DC, HPLC) drei neue Flavonolignane vom Dihydrobenzofuran-Typ in Form ihrer Acetate isoliert und strukturell hauptsächlich mit Hilfe spektroskopischer Methoden aufgeklärt.
Flavon A wurde als 3-Desoxy-Isosilychristin identifiziert. Es ist isomer mit Flavon B₂ und unterscheidet sich von diesem nur in der Konfiguration am C-2. Durch CD-Messung konnte für Flavon A eindeutig eine 2R-Konfiguration bestimmt werden. Die relative Konfiguration im Dihydrobenzofuranteil konnte durch Bestimmung von Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen als trans ermittelt werden. Die Konformationsanalyse zeigte, daß der aromatische Substituent am C-2 pseudoequatorial orientiert ist. Im Dihydrobenzofuranteil ist eine trans-pseudoaxiale Stellung des Guajacylrests auf Grund der NMR-Daten zu postulieren. Flavon A stellt somit das erste Flavonolignan mit dieser Stereochemie dar.
Flavon B₁ besitzt die Struktur eines 3-Desoxy-Silychristins. Es stellt neben den homologen 3-Desoxy-Flavonolignan Silandrin und Silymonin die dritte noch fehlende Verknüpfungsvariante zwischen Flavanon und Coniferylalkohol dar. Die Konfiguration am C-2 kann auf Grund der CD-Messung als 2S angegeben werden. Durch NMR-Untersuchungen ließ sich die relative Konfiguration im Dihydrobenzofuranteil als trans bestimmen. Die NMR-Untersuchung zeigte außerdem für den Flavananteil einen pseudoequatorial angeordneten Aromaten am C-2 und einen ebenfalls trans-pseudoequatorial orientierten Guajacylrest am C- α .

Flavon B₂ erwies sich in seiner Konstitution als identisch mit dem Flavon A. Die Konfiguration am C-2 wurde als 2S bestimmt. Auf Grund von ¹H-NMR, CD-Untersuchung und Messung der optischen Rotation muß es sich bei Flavon B₂ um ein Diastereomer von Flavon A handeln.

Sowohl im Flavanon- als auch im Coniferylteil liegen die gleichen Konformationsverhältnisse wie im Flavon A vor.

2. Die Stereochemie der neu isolierten Isomere sowie der bisher bekannten Flavonolignane aus *Silybum marianum* wurde weitgehend geklärt. Für das bisher als einheitlich angesehene Silandrin wurde zum erstenmal durch HPLC-Untersuchung das Vorliegen als Stereoisomerengemisch bewiesen.
3. Zusätzlich zu den neuen Flavonolignanen gelang die Isolierung von Eriodictyol, Naringenin, Apigenin und Chrysoeriol. Eriodictyol und Naringenin können als biosynthetische Vorstufen der 3-Desoxy-Flavonolignane angesehen werden.
4. In verschiedenen in-vivo- und in-vitro-Testmodellen wurden die aus der bearbeiteten Droge isolierten Substanzen auf ihre Leberschutzwirkung hin getestet. Dabei zeigte das Gemisch der drei neu isolierten Flavonolignane im CCl₄- und Galactosamin-Hepatozytenmodell eine deutliche Schutzwirkung. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchung aller anderen bekannten Flavonolignane im gleichen Modell komplementiert.

5. Aus fünf Drogen, die hauptsächlich in der Volksmedizin Indiens als Lebertherapeutika eingesetzt werden, wurden Fraktionen und Substanzgemische auf ihre Leberschutzwirkung hin untersucht.

- a) Ein Butea-monosperma-Extrakt zeigte in vivo und in vitro eine ausgeprägte Schutzwirkung vor Vergiftung mit CCl_4 und GalN. Eine Fraktion des Drogenextrakts besaß einen starken Stimulierungseffekt auf die RNA-Synthese, wie ein Test mit isolierter Polymerase A bewies. Als wirksamer Bestandteil dieser Fraktion konnte das Isomergemisch Butrin/Isobutrin ermittelt werden.
- b) Ein Methanolextrakt von Eclipta alba übte in verschiedenen Modellen eine starke Schutzwirkung gegenüber Lebergiften sowie eine Stimulierung der RNA-Synthese aus.
- c) Von den beiden getesteten Extrakten aus Lophophytum leandri und Picrorhiza kurroa zeigte im Hepatozyten-Modell nur der erste eine ausgeprägte Schutzwirkung gegenüber einer Schädigung durch GalN.
- d) Eine Fraktion von Wedelia calendulacea erwies sich im Hepatozyten-Modell als wirksam gegenüber CCl_4 -Intoxikation. Ob die Hauptverbindung Wedelolacton mit dieser Wirkung in Verbindung steht, konnte nicht geklärt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL

1. Herkunft des Drogenmaterials

- a) Früchte der weißblühenden Varietät von Silybum marianum (Nr. 1110)

Lieferant: Prof. P. Tétényi, Institut für Arzneipflanzenforschung Budakalász, Ungarn.

Aus diesem Drogenmaterial wurde Fraktion I (s. S. 13) gewonnen.

- b) MeOH-Gesamtextrakt aus Früchten der weißblühenden Varietät von Silybum marianum

Dieser Extrakt, der Fraktion II (s. S. 13) lieferte, war am 20.11.1980 an unserem Institut aus von Prof. P. Tétényi gelieferter Droge hergestellt worden.

- c) Getrocknete Blüten von Butea monosperma (Nr. 8150)

Lieferant: Zandu Pharm. Works Ltd., Bombay, Indien.

- d) Getrocknete oberirdische Bestandteile von Eclipta alba (Nr. 8150)

Lieferant: Zandu Pharm. Works Ltd., Bombay, Indien.

- e) Pulverisierte oberirdische Bestandteile von Wedelia calendulacea

Lieferant: Pharm. Products Ltd., Thanjavur, Indien.

- f) Lophophytum leandri

Lieferant: Dr. Schwabe, Karlsruhe
Fa. Celo, Zweibrücken

- g) Getrocknete Wurzeln von Picrorhiza kurroa

Lieferant: Hamdard Center, New Delhi, Indien.

2. Herkunft der Vergleichssubstanzen

Silybin, Silydianin, Silychristin, Silandrin, Silymonin,
5,7-Dihydroxychromon, Eriodictyol, Taxifolin, Naringenin,
Apigenin, Luteolin, Chrysoeriol, Diosmetin:

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität
München

3. Allgemeine Arbeitsmethoden

3.1. Dünnschichtchromatographie

3.1.1. Adsorbentien

für die analytische DC:

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke
0.25 mm, Fa. Merck (Art.Nr. 5715)

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC)
10 x 20 cm, Fa. Merck (Art.Nr. 5642)

für die präparative DC:

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke
0.5 mm, Fa. Merck (Art.Nr. 5744)

Auftragetechnik:

analytisch: bandförmig mit ausgezogenen Kapillarröhrchen

präparativ: bandförmig mit schablonegeführter Mikroliter-
Pipette, deren Öffnung mit wenig Watte ver-
schlossen wurde.

3.1.2. Laufmittelsysteme

a) Silybum marianum var. alb.

- LM I Chloroform-Aceton-Ameisensäure (9:2:1)
LM II Toluol-Aceton-Ameisensäure (9:2:1)
LM III Dichlormethan-Methanol-Wasser (14:6:4),
Unterphase

b) Acetate

- LM IV Dichlormethan-Aceton (100:4)

c) Butea monosperma

- LM V Ethylacetat-Wasser-Ameisensäure (20:6:4)
LM VI Toluol-Aceton-Methanol-Ameisensäure (8:10:3:1)

d) Eclipta alba, Wedelia calendulacea

- LM VII Ethylacetat-Wasser-Ameisensäure (15:3:2)
LM VIII Toluol-Aceton-Ameisensäure (11:6:1)

3.1.3. Detektion

- a) auf Kieselgel F₂₅₄ Löschung im UV 254
b) Farbreaktion und/oder Fluoreszenz im UV 360 nach Besprühen mit Naturstoffreagenz (1 %ige methanolische Lösung) und PÄG 4000 (5 %ige ethanolische Lösung)
c) Farbreaktion nach Besprühen mit FeCl₃ (5 %ige ethanolische Lösung)

3.2. Säulenchromatographie

3.2.1. Adsorbens

Kieselgel 60 Merck, Korngröße unter 0.063 mm (feiner als 230 mesh ASTM), Art.Nr. 7729

3.2.2. Laufmittel

Dichlormethan-Aceton 2 : 1 (V/V)

3.2.3. Packtechnik

Das Kieselgel wurde mit dem Laufmittel zu einer homogenen Suspension angerührt und in die schräggestellte Glassäule (Ø 5 cm, Länge 60 cm) eingegossen. Nach Aufrichten der Säule wurde die Füllung mit einem Rundfilter und wenig Seesand abgedeckt. Vor dem Auftragen wurde solange mit Elutionsmittel gewaschen, bis die Füllhöhe konstant blieb (ca. 40 cm). Der zu trennende Extrakt wurde mit wenig Kieselgel angerieben, auf die Säule aufgetragen und mit wenig Seesand bedeckt. Durch Aufsetzen einer zweiten, mit Elutionsmittel gefüllten Säule ließ sich der hydrostatische Druck erhöhen und damit die Trennung verbessern.

Das Eluat wurde mit einem Fraktionsschneider in Fraktionen zu je 15 ml aufgefangen.

3.3. HPLC

Apparative Daten

- a) Liquidchromatograph Hewlett-Packard HP 1082 B mit Autosampler und HP 1040 A Dioden Array Spektralphotometer
- b) Pumpe: M 6000 A (Waters GmbH, Königstein)
Gradientenprogrammer: M 660 (Waters GmbH, Königstein)
Einspritzteil: WISP 710 B (Waters GmbH, Königstein)
Datensystem: M 770 (Waters GmbH, Königstein)
Detektor: LC 75 (Perkin-Elmer, Überlingen)
- c) Pumpe: Perkin-Elmer Serie 3 B
Injektionssystem: U 6 K (Waters Assoc.)
Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotometer

Lösungsmittel

Als Fließmittel für die HPLC wurden ausschließlich Lösungsmittel in ChromAR-Qualität der Fa. Promochem, Wesel, verwendet.

Einspritzmenge

Reinsubstanzen: 5 - 10 µl einer 0.02 %igen Lösung

Extrakte: 5 µl einer 0.5 %igen Lösung (analytisch)
50 - 100 µl einer 3 %igen Lösung (präparativ)

3.3.1. Analytische HPLC

- a) Vergleich der weißblühenden und violettblühenden Varietät von *Silybum marianum* mit quantitativer Bestimmung der Inhaltsstoffe

Apparative Daten: siehe 3.3. a) und b)

Säule: LiChrosorb[®] RP-18, 5 μ m (125 x 4 mm ID, Stahl)
(Hibar[®], Merck)

Laufmittel A: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 10 : 90 : 5

B: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 50 : 50 : 5

Gradient: von 0 % B nach 100 % B in 25 min, linear

Durchflußrate: 1.0 ml/min

Detektion: 280 nm (0.08)

Papiervorschub: 0.5 mm/min

- b) Auftrennversuche von "Flavon G"; Identifizierung von
Eriodictyol und Naringenin

Apparative Daten: siehe 3.3. c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (300 x 7.8 mm ID) (Waters Assoc.)

Laufmittel: Methanol-Wasser-Essigsäure 50 : 50 : 5

Durchflußrate: 3.0 ml/min

Detektion: 285 nm (0.04 bzw. 0.1)

Papiervorschub: 0.5 mm/min

- c) Identifizierung von Chrysoeriol/Apigenin ("Flavon Z")

Apparative Daten: siehe 3.3. c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (300 x 7.8 mm ID) (Waters Assoc.)

Laufmittel: Methanol-Wasser-Essigsäure 50 : 50 : 5

Durchflußrate: 3.0 ml/min

Detektion: 340 nm (0.1)

Papiervorschub: 0.5 mm/min

3.3.2. Präparative HPLC

a) Fraktionierung von "Flavon G"

Apparative Daten: siehe 3.3. c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (300 x 7.8 mm ID)(Waters Assoc.)

Laufmittel: Methanol-Wasser 47 : 53

Durchflußrate: 2 - 3 ml/min

Detektion: 285 nm

Papiervorschub: 0.5 mm/min

b) Isolierung von Naringenin ("Substanz E")

Apparative Daten: siehe 3.3. c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (300 x 3.9 mm ID)(Waters Assoc.)

Laufmittel: Methanol-Wasser 40 : 60

Durchflußrate: 2 ml/min

Detektion: 280 nm

Papiervorschub: 0.5 mm/min

c) Isolierung von Chrysoeriol/Apigenin ("Flavon Z")

Apparative Daten: siehe 3.3. c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (300 x 7.8 mm ID)(Waters Assoc.)

Laufmittel: Methanol-Wasser 50 : 50

Durchflußrate: 2 - 3 ml/min

Detektion: 340 nm

Papiervorschub: 0.5 mm/min

3.4. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden in der Trockenpistole über Phosphor-pentoxid getrocknet. Die Schmelzpunkte bestimmten wir auf der Kofler-Heizbank der Fa. Reichert, Wien. Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Optische Drehung

Die Messung erfolgte im lichtelektrischen Polarimeter der Fa. Zeiss (LEP A 2). Die Substanzen wurden in Methanol bzw. Chloroform UVASOL[®] der Fa. Merck gelöst.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden in methanolischer Lösung mit dem UV-Spektrophotometer DB-GT der Fa. Beckman gemessen (Ausnahme: bei *Butea monosperma* in Ethanol). Es wurde ausschließlich p.a.-Qualität verwendet.

IR-Spektren

Die Substanzen wurden in Kaliumbromid gepreßt mit einem AccuLab-1 Spektrophotometer der Fa. Beckman gemessen. Die Konzentration betrug i.a. 1.3 mg/130 mg KBr.

CD-Spektren⁺⁾

Die Aufnahme der CD-Kurven erfolgte mit dem Jobin-Yvon Auto-Dichrograph Mark V. Die Konzentration der Lösungen betrug i.a. 0.5 mMol/l, die Schichtdicke der Küvetten 0.1 cm. Als Lösungsmittel dienten Acetonitril und Dioxan in ChromAR-Qualität der Fa. Promochem, Wesel.

⁺⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. H. SCHEER, Botanisches Institut der Universität München, für die Durchführung der Messungen.

Massenspektren

Die Messung erfolgte mit dem Massenspektrometer MS 30 der Fa. AEI.

Aufnahmebedingungen: 4 kV, 70 eV, 300 μ A, Ionenquellentemperatur (ST) 200 - 300 $^{\circ}$ C, 10^{-6} Torr.

1 H-NMR-Spektren

Die Routinespektren (80 MHz) wurden an unserem Institut mit einem Bruker WP-80 Kernresonanzspektrometer aufgenommen.

Die Messungen bei 200 MHz erfolgten mit einem Bruker WP-200 Kernresonanzspektrometer im Institut für Anorganische Chemie der Universität München.⁺⁾

Die Messungen bei 400 MHz wurden am Institut für Organische Chemie der TU Berlin mit einem WM-400 Kernresonanzspektrometer durchgeführt.⁺⁺⁾

⁺⁾ Wir danken Herrn Prof.Dr.H.NÖTH, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, für die Aufnahme der Spektren.

⁺⁺⁾ Wir danken Herrn Prof.Dr.F.BOHLMANN, Institut für Organische Chemie der TU Berlin, für die Durchführung der Messungen.

4. Chemische Verfahren

4.1. Hydrolyse der BuOH-Fraktion von Butea monosperma

50 mg der zur Trockene eingeeengten BuOH-Ausschüttelung wurden mit 80 ml 5 %iger H_2SO_4 (in EtOH/ H_2O 1:1) versetzt und unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach 2 Stunden wurde der EtOH-Anteil der Lösung im Vakuum entfernt und der nun wäßrigen Lösung bis zur annähernden Neutralisierung $BaCO_3$ zugegeben. Um eventuell ausgefallenes Aglykon wieder in Lösung zu bringen, wurden 10 ml MeOH zugegeben. Danach wurde filtriert und der MeOH-Anteil des Filtrats im Vakuum entfernt.

Die wäßrige Lösung wurde dreimal mit EtOAc ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum vollständig eingeeengt.

4.2. Acetylierungen

50 mg Substanz der HPLC-Fraktion G/A wurden im Schliffkolben mit je 1 ml Acetanhydrid und Pyridin p.a. versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch eine Probe-DC, auf die von dem Reaktionsgemisch bzw. dessen EtOAc-Ausschüttelung aufgetragen wurde, ließ sich die Vollständigkeit der Umsetzung überprüfen. Im Falle einer unvollständigen Acetylierung, die durch das Auftreten mehrerer Zonen auf der DC zu erkennen war, wurde die Reaktionszeit auf 70 Stunden verlängert.

Danach erfolgte die Zugabe von 5 ml eisgekühlten Wassers. Nach mindestens 2 Stunden Stehenlassen bei 6 °C wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt und bei 40 °C getrocknet. Die Ausbeute an Rohacetat ließ sich durch Ausschütteln der Wasserphase mit CH_2Cl_2 weiter erhöhen.

Die anderen Acetylierungen wurden entsprechend dieser Beschreibung durchgeführt. Aus 130 mg der HPLC-Fraktion G/B wurden so 150 mg Rohacetat gewonnen.

Die Acetylierung von 100 mg Substanz aus der BuOH-Ausschüttelung von *Butea monosperma* ergab 110 mg Peracetat.

4.3. Permethylierung nach BRIMACOMBE (81, 82)

Ca. 1 mg Substanz wurde in 0.5 ml Dimethylformamid (wasserfrei) gelöst, mit 0.5 mg Natriumhydrid-Pulver versetzt und unter Stickstoffatmosphäre 10 min zur Reaktion gebracht (Gasentwicklung unter Gelb- bis Rotfärbung). Darauf wurde 1 - 2 ml Methyljodid frisch destilliert zugegeben und unter Stickstoffatmosphäre und Lichtausschluß sowie gelegentlichem Umschütteln bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bei Farblosigkeit bzw. Aufhellen der Lösung war die Reaktion beendet.

Überschüssiges Solvens und Reagenz wurden im Vakuum bei 40 °C abgezogen und der Rückstand mit Ether p.a. aufgenommen, wobei Natriumjodid ausfiel. Unter Kühlung wurden dann 15 ml Wasser zugegeben und mit Ether p.a. ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und einrotiert. Es verblieb ein farbloser bis gelblicher Rückstand, der zur MS verwendet wurde.

5. Spezielle Arbeitsmethoden

5.1. Untersuchung von *Silybum marianum* var. alb.

Die Bearbeitung der Droge erfolgte nach dem auf S. 25 angegebenen Schema.

5.1.1. Extraktion

750 g zerkleinerte Früchte der weißblühenden Varietät von *Silybum marianum* (Nr. 1110) wurden mit 3 l Petrolether im Soxhlet eine Woche lang entfettet. Der Petroletherextrakt wurde verworfen, die entfettete Droge an der Luft vollständig getrocknet.

Anschließend wurde im Soxhlet eine Woche lang mit 3 l Methanol extrahiert. Nach Einengen der methanolischen Lösung blieben 60 g Trockenextrakt zurück ($\hat{=}$ 8.0 % Ausbeute).

5.1.2. Anreicherung

30 g des mit wenig Kieselgel verriebenen frisch hergestellten MeOH-Extrakts wurden auf drei vorbereitete Kieselgelsäulen (siehe 3.2.3.) gleichmäßig auf die von wenig Elutionsmittel bedeckte Seesandschicht aufgetragen. Als Elutionsmittel diente CH_2Cl_2 -Aceton im Volumenverhältnis 2 : 1. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 40 - 60 Tr./min.

Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 15 ml aufgefangen und chromatographiert. Der Inhalt der entsprechenden Gläser wurde vereinigt und im Vakuum eingeeengt. Damit standen Fraktionen zur Verfügung, in denen jeweils unterschiedliche Abschnitte der DC stark angereichert vorlagen. Die Fraktion, in der Flavon G angereichert war, wurde als Fraktion I bezeichnet.

In gleicher Weise erfolgte die Auftrennung von 20 g des während der Voruntersuchung verwendeten Rohextrakts. Die Flavon-G-haltige Fraktion wurde als Fraktion II bezeichnet.

5.1.3. Isolierung von Flavon G

Die Fraktion I aus der Säulenchromatographie wurde in Methanol aufgenommen und wie beschrieben auf 40 Kieselgelplatten zur präparativen DC aufgetragen. Nach zweimaligem Entwickeln in LM III wurden alle Platten kalt abgefeht und die von Flavon G hervorgerufene Fluoreszenzlösung im UV 254 mit Bleistift markiert. Als Referenzsubstanz diente das aus der Voruntersuchung stammende Flavon-G-Material.

Die gekennzeichneten Flächen wurden ausgekratzt und das Kieselgel auf dem Magnetrührer dreimal 20 min lang mit je 20 ml Aceton p.a. eluiert. Darauf wurde abdekantiert und durch eine Glasfritte G4 filtriert. Durch Membranfiltration erfolgte die Entfernung letzter Reste an Kieselgel im Filtrat (Sartorius Typ SM, Porengröße 0.45 μ m).

Nach Einengen der Lösung erhielten wir 300 mg Flavon G. Eine anschließende Nachelution des Kieselgels mit dem polareren Gemisch Aceton-Methanol 1 : 1 brachte keine weitere Desorption von Flavon G.

Auf gleiche Weise wurde aus Fraktion II nach Auftrennung über 20 Kieselgelplatten 100 mg Flavon G isoliert.

5.1.4. HPLC-Fraktionierung

330 mg Flavon G wurden im Laufe von 110 Injektionen durch präparative HPLC in Fraktion G/A und Fraktion G/B aufgetrennt. Pro Injektion konnten 3 mg in MeOH gelöstes Flavon G in einem Zeitraum von 40 min chromatographiert werden. Die aufgefangenen Fraktionen wurden im Vakuum vom Methanol befreit und anschließend gefriergetrocknet.

Die Ausbeute betrug 60 mg Substanz aus Fraktion G/A und 150 mg Substanz aus Fraktion G/B.

5.1.5. Acetylierung

Die Acetylierung der Fraktionen G/A und G/B wurde entsprechend den Angaben (s. Exp. Teil, 4.2.) durchgeführt. Aus 50 mg eingesetzter Fraktion G/A wurden 51 mg G/A-Acetat erhalten.

Aus 130 mg eingesetzter Fraktion G/B wurden 150 mg G/B-Acetat gewonnen.

5.1.6. Isolierung von Flavon-A-acetat

50 mg acetylierte Fraktion G/A wurden auf 10 Kieselgelplatten der Schichtdicke 0.5 mm (Fa. Merck) wie beschrieben aufgetragen (s. Exp. Teil, 3.1.1.). Die Entwicklung erfolgte in LM IV. Anschließend wurde kalt abgefönt und erneut im selben Laufmittel entwickelt.

Nach Detektion im UV 254 wurde die markierte Substanzzone ausgekratzt und mit 20 ml CH_2Cl_2 -Aceton p.a. 1 : 1 versetzt. Es folgte eine 15 min dauernde Elution des Kieselgels auf dem Magnetrührer und anschließend die Filtration durch eine Glasfritte G4. Nach zweimaligem Wiederholen der Elution wurde das Filtrat im Vakuum zur Trockene eingeeengt und in 3 ml CH_2Cl_2 p.a. aufgenommen. Auf diese Weise ließ sich der miteluierte Plattenkleber entfernen, der an der Kolbenwand haften blieb. Die CH_2Cl_2 -Lösung wurde durch Membranfiltration (Sartorius Typ SM, Porenweite 0.45 μm) von letzten Kieselgelresten befreit und im Vakuum bei 30 °C eingeeengt. Ein anschließendes Auswaschen des Kieselgels mit Aceton p.a. führte zu keiner weiteren Desorption von Acetat.

Der gesamte Isolierungsschritt vom Auftragen der Substanz bis zum Einrotieren des Filtrats war innerhalb eines Tages

durchgeführt worden, da bei längerem Kontakt der Substanz mit der Kieselgelschicht Zersetzungserscheinungen auftraten.

Nach dieser Isolierung standen 15 mg Flavon-A-acetat von hohem Reinheitsgrad zur Strukturaufklärung zur Verfügung.

5.1.7. Physikalische Daten von Flavon A, bzw. Flavon-A-acetat

a) Flavon A

$C_{25}H_{22}O_9$ (466.44)

Schmp. 180-185 °C

R_f (DC): 0.38 (LM I)

$[\alpha]_D^{26}$: + 99.0 (c = 0.189 in MeOH)

UV:(MeOH): λ_{max} = 288(log ϵ 4.02), 322(sh) nm

IR:(KBr): ν = 3420, 1640, 1510, 1450, 1350, 1270,
1180, 1160, 1120, 1080, 1060, 1030, 820 cm^{-1}

MS: (4 kV, 70 eV, 300 μA , ST 300 °C)
 m/e (rel.Int.%) = 466(3), 448(18), 436(8),
296(18), 283(15), 270(47), 178(15), 153(100),
137(35), 126(35), 124(23), 109(26), 105(71),
77(38)

CD: (CH_3CN , 0.64 mMol/l, d = 0.1 cm)
 $\lambda_{max}(\Delta\epsilon)$ = 338 nm(-2.77), 308(+5.76), 278
(+2.50), 258(-0.89), 236(+2.7), 215(-11.8).

b) Flavon-A-acetat

$C_{35}H_{32}O_{14}$ (676.63)

Schmp. 95-97 °C

R_f (DC): 0.38 (LM IV)

$[\alpha]_D^{26}$: + 34.8 ($c = 0.315$ in $CHCl_3$)

UV:(MeOH): $\lambda_{max} = 262, 280(sh), 305$ nm

IR:(KBr): $\nu = 2940, 1770, 1740, 1690, 1620, 1575, 1510, 1430, 1370, 1190, 1130, 1070, 1030, 900, 825$ cm^{-1}

MS: (4 kV, 70 eV, 300 μA , ST 250 °C, PT 200 °C)
 m/e (rel.Int.%) = 676(1), 658(2), 634(3), 616(4), 592(11), 574(7), 550(7), 532(16), 514(4), 490(30), 472(4), 448(10), 430(4), 366(3), 354(4), 337(4), 328(7), 309(5), 296(18), 280(12), 263(7), 237(7), 219(4), 195(26), 179(5), 153(100), 137(24), 124(4)

CD: (CH_3CN , 0.50 mMol/l, $d = 0.1$ cm):
 $\lambda_{max}(\Delta\epsilon) = 340$ nm(-3.15), 308(+6.69), 280(+3.54), 256(-0.93), 236(+2.8), 222(-14.1)
 (Dioxan, 0.55 mMol/l, $d = 0.1$ cm):
 $\lambda_{max}(\Delta\epsilon) = 340$ nm(-3.30), 308(+8.02), 282(+2.85), 262(-1.26), 236(+4.0), 218(-17.0)

1H -NMR: (200 MHz, $CDCl_3$, TMS int.):
 $\delta = 2.06$ ppm, 2.28, 2.30, 2.34, 2.37(s, 15H, -OAc); 2.80(dd, 1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=3$ Hz, H-3_e); 3.11(dd, 1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=13$ Hz, H-3_a); 3.80(s, 3H, -OCH₃); 3.9(m, 1H, H- β); 4.37(d, 2H, $J=5$ Hz, H- γ); 5.56(dd, 1H, $J_1=13$ Hz, $J_2=3$ Hz, H-2); 5.66(d, 1H, $J=3.5$ Hz, H- α); 6.54(d, 1H, $J=2.2$ Hz, H-6); 6.68(d, 1H, $J=2.2$ Hz, H-8);

6.84(dd, 1H, $J_1=2$ Hz, $J_2=8$ Hz, H-6"); 6.95
(d, 1H, $J=2$ Hz, H-2"); 7.00(d, 2H, $J=8$ Hz,
H-6', 5"); 7.08(d, 1H, $J=8$ Hz, H-5').

(400 MHz, CDCl_3 , TMS int.):

Verschiebungswerte und Kopplungskonstanten entsprechen denen im 200-MHz-Spektrum (s. oben).

Ausnahme:

Aufspaltung des breiten Dubletts bei 4.37 ppm:

4.35(dd, 1H, $J_1=11$ Hz, $J_2=7$ Hz, H- γ_1);

4.40(dd, 1H, $J_1=11$ Hz, $J_2=5$ Hz, H- γ_2).

5.1.5. Isolierung von Flavon-B₁-acetat und Flavon-B₂-acetat

150 mg acetylierte Fraktion G/B wurden entsprechend den Angaben für Flavon-A-acetat (s. S. 132) durch präparative DC in Flavon-B₁-acetat und Flavon-B₂-acetat aufgetrennt und isoliert.

Die Ausbeuten an Flavon-B₁-acetat bzw. Flavon-B₂-acetat betrugen 37 mg bzw. 21 mg.

5.1.9. Physikalische Daten von Flavon-B₁-acetat

$\text{C}_{35}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$ (676.63)

Schmp. 93-95 °C

R_f (DC): 0.38 (LM IV)

$[\alpha]_D^{26}$: + 29.9 ($c = 0.283$ in CHCl_3)

UV:(MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 262, 280(\text{sh}), 305$ nm

IR:(KBr): $\nu = 2935, 1770, 1740, 1690, 1620, 1575, 1510,$
1490, 1430, 1370, 1190, 1125, 1070, 1025,
895, 740 cm^{-1}

- MS: (4 kV, 70 eV, 300 μ A, ST 250 $^{\circ}$ C)
 $m/e(\text{rel. Int.}\%) = 676(<1), 658(<1), 634(<1), 616(1), 592(3), 574(4), 550(3), 532(29), 514(2), 490(80), 472(3), 448(84), 433(7), 416(7), 322(7), 296(41), 281(20), 263(10), 251(13), 219(8), 195(19), 179(20), 153(100), 137(24).$
- CD: (CH_3CN , 0.50 mMol/l, $d = 0.1$ cm)
 $\lambda_{\text{max}}(\Delta\epsilon) = 336 \text{ nm}(+2.21), 310(-3.66), 286(-1.07), 270(+1.38), 230(+11.1).$
- $^1\text{H-NMR}$: (200 MHz, CDCl_3 , TMS int.):
 $\delta = 2.09 \text{ ppm}, 2.30, 2.31, 2.33, 2.38(\text{s}, 15\text{H}, -\text{OAc}); 2.77(\text{dd}, 1\text{H}, J_1=16.5 \text{ Hz}, J_2=3 \text{ Hz}, \text{H}-3_e); 3.03(\text{dd}, 1\text{H}, J_1=16.5 \text{ Hz}, J_2=13.5 \text{ Hz}, \text{H}-3_a); 3.8(\text{m}, 1\text{H}, \text{H}-\beta); 3.83(\text{s}, 3\text{H}, -\text{OCH}_3); 4.4(\text{m}, 2\text{H}, \text{H}-\gamma); 5.42(\text{dd}, 1\text{H}, J_1=13.5 \text{ Hz}, J_2=3 \text{ Hz}, \text{H}-2); 5.60(\text{d}, 1\text{H}, J=6 \text{ Hz}, \text{H}-\alpha); 6.54(\text{d}, 1\text{H}, J=2.2 \text{ Hz}, \text{H}-6); 6.79(\text{d}, 1\text{H}, J=2.2 \text{ Hz}, \text{H}-8); 6.92(\text{dd}, 1\text{H}, J_1=1.6 \text{ Hz}, J_2=8 \text{ Hz}, \text{H}-6''); 7.03(\text{d}, 1\text{H}, J=8 \text{ Hz}, \text{H}-5''); 7.04(\text{d}, 1\text{H}, J=1.6 \text{ Hz}, \text{H}-2''); 7.09(\text{d}, 1\text{H}, J=1.3 \text{ Hz}, \text{H}-6'); 7.16(\text{d}, 1\text{H}, J=1.3 \text{ Hz}, \text{H}-2').$
- (400 MHz, CDCl_3 , TMS int.):
 Verschiebungswerte und Kopplungskonstanten entsprechen denen im 200-MHz-Spektrum (s. oben).
 Ausnahme:
 Aufspaltung des Multipletts bei 4.4 ppm:
 $4.36(\text{dd}, 1\text{H}, J_1=11 \text{ Hz}, J_2=7.5 \text{ Hz}, \text{H}-\gamma_1); 4.45(\text{dd}, 1\text{H}, J_1=11 \text{ Hz}, J_2=5.5 \text{ Hz}, \text{H}-\gamma_2).$

5.1.10. Physikalische Daten von Flavon-B₂-acetat

C₃₅H₃₂O₁₄ (676.63)

Schmp. 98-100 °C

R_f(DC): 0.48 (LM IV)

[α]_D²⁶: + 124.8 (c = 0.255 in CHCl₃)

UV:(MeOH): λ_{max} = 262, 280(sh), 305 nm

IR:(KBr): ν = 2940, 1770, 1740, 1690, 1620, 1575, 1510, 1430, 1370, 1190, 1130, 1070, 1030, 900, 825 cm⁻¹

MS: (4 kV, 70 eV, 300 μA, ST 250 °C)
m/e(rel.Int.%) - 676(<1), 658(<1), 634(<1), 616(<1), 592(3), 574(1), 550(4), 532(6), 514(2), 508(2), 490(16), 472(3), 448(17), 430(2), 366(1), 354(2), 337(2), 328(3), 324(4), 309(5), 296(16), 280(11), 263(7), 237(3), 219(2), 195(13), 179(5), 153(100), 137(24), 124(5).

CD: (CH₃CN, 0.50 mMol/l, d = 0.1 cm)
λ_{max}(Δε) = 338 nm(+4.22), 310(-9.84), 286(-2.82), 270(+8.14), 220(+81.8).

¹H-NMR: (200 MHz, CD₃CN, TMS int.):
δ = 2.16 ppm, 2.22, 2.25, 2.28, 2.29(s, 15H, -OAc); 2.65(dd, 1H, J₁=17 Hz, J₂=2.5 Hz, H-3_e); 3.25(dd, 1H, J₁=17 Hz, J₂=13.5 Hz, H-3_a); 3.87 - 3.99(m, 1H, H-β); 3.75(s, 3H, -OCH₃); 4.26(dd, 1H, J₁=11 Hz, J₂=8.5 Hz, H-γ₁); 4.47(dd, 1H, J₁=11 Hz, J₂=4.5 Hz, H-γ₂); 5.57(dd, 1H, J₁=13.5 Hz, J₂=2.5 Hz, H-2); 5.70(d, 1H, J=3 Hz, H-ε); 6.56(d, 1H, J=2.2 Hz, H-6); 6.74(d, 1H, J=2.2 Hz, H-8); 6.88(dd, 1H, J₁=1.8 Hz, J₂=8 Hz, H-6''); 7.01(d, 1H, J=8 Hz, H-5''); 7.02(d, 1H, J=1.8 Hz, H-2''); 7.11(d, 1H, J=8 Hz, H-6'); 7.16(d, 1H, J=8 Hz, H-5').

$^1\text{H-NMR}$: (200 MHz, CDCl_3 , TMS int.):
 δ = 2.06 ppm, 2.30, 2.35, 2.37(s, 15H, -OAc);
2.68(dd, 1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=2.5$ Hz, H-3_e); 3.12
(dd, 1H, $J_1=17$ Hz, $J_2=13.5$ Hz, H-3_a); 3.8(m,
1H, H- β); 3.81(s, 3H, -OCH₃); 4.28(dd, 1H, $J_1=$
11 Hz, $J_2=8.5$ Hz, H- γ_1); 4.49(dd, 1H, $J_1=11$ Hz,
 $J_2=4.5$ Hz, H- γ_2); 5.51(dd, 1H, $J_1=13.5$ Hz, $J_2=$
2.5 Hz, H-2); 5.72(d, 1H, $J=3$ Hz, H- α); 6.55(d,
1H, $J=2.2$ Hz, H-6); 6.76(d, 1H, $J=2.2$ Hz, H-8);
6.83(dd, 1H, $J_1=8$ Hz, $J_2=1.8$ Hz, H-6''); 6.98 -
7.04(m, 2H, H-2'', 5''); 7.08(s_{br}, 2H, H-5', 6').

(400 MHz, CDCl_3 , TMS int.):

Verschiebungswerte und Kopplungskonstanten entsprechen denen im 200-MHz-Spektrum(s. oben).

Ausnahme:

Aufspaltung der Signale bei 6.98-7.04 und
7.08 ppm:

6.98(d, 1H, $J=1.8$ Hz, H-2''); 7.01(d, 1H,
 $J=8$ Hz, H-5''); 7.07(d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-5');
7.09(d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-6').

5.1.11. Isolierung von Eriodictyol

Parallel zur Isolierung von Flavon G aus Fraktion I durch präparative DC über 40 Kieselgelplatten (s. S. 131) wurde die in LM III unmittelbar über Flavon G liegende Substanzzone (Zone Nr. 3) ausgekratzt und zweimal 30 min mit je 20 ml Aceton p.a. auf dem Magnetrührer eluiert. Nach Filtration durch eine Glasfritte G4 wurde im Vakuum vollständig eingeeengt. Der verbleibende Rückstand wurde in 2 ml MeOH p.a. aufgenommen und über präparative DC in LM I gereinigt.

Nach Membranfiltration kristallisierte Eriodictyol aus Methanol aus. Die Ausbeute betrug 5 mg.

5.1.12. Physikalische Daten von Eriodictyol

5,7,3', 4' -Tetrahydroxy-flavanon

C₁₅H₁₂O₆ (288.26)

Schmp. 258 °C aus MeOH (Lit. 262-267 °C)

R_f (DC): 0.50 (LM I)

UV:(MeOH): $\lambda_{\max}$ = 289, 330(sh) nm

IR:(KBr): ν = 3360, 1635, 1600, 1450, 1340, 1305, 1255, 1215, 1185, 1155, 1115, 1080, 1065, 1010, 950, 855, 820, 770, 730 cm⁻¹

MS: (4 kV, 70 eV, 300 μ A, ST 230 °C)
m/e(rel.Int.%) = 288(59), 287(35), 271(10), 270(7), 260(4), 245(5), 229(3), 179(27), 166(44), 153(100), 136(52), 123(20).

5.1.13. Isolierung von Naringenin ("Substanz E")

Der während der Voruntersuchung verwendete Silybum-Rohextrakt lieferte nach säulenchromatographischer Auftrennung (s. S. 130) mehrere Fraktionen, in denen vor allem die lipophileren Verbindungen des Extrakts angereichert waren. Nach Einengen und Auftragen dieser Fraktionen auf 40 Kieselgelplatten (Fa. Merck, 0.5 mm) wurden diese in LM II entwickelt und die in Abb. 6, S. 15, mit Nr. 6 und

Nr. 7 bezeichnete Mischzone ausgekratzt. Nach Elution mit 2 x 20 ml Aceton (zweimal 30 min) und Filtration durch eine Glasfritte G4 erfolgte die Abtrennung des miterfaßten 5,7-Dihydroxychromons (Zone Nr. 7, Abb. 6) über präparative HPLC.

Die aufgefangenen Fraktionen wurden zur Trockene eingengt und lieferten 5 mg an Substanz, die aus Methanol in feinen Stäbchen auskristallisierte.

5.1.14. Physikalische Daten von Naringenin ("Substanz E")

5,7,4'-Trihydroxy-flavanon

$C_{15}H_{12}O_5$ (272.26)

Schmp. 248 °C, aus MeOH (Lit. 248-251 °C)

R_f (DC): 0.67 (LM I)

UV:(MeOH): λ_{max} = 288, 325(sh) nm

IR:(KBr): ν = 3280, 1630, 1600, 1520, 1495, 1460, 1340, 1310, 1250, 1180, 1160, 1080, 1060, 1010, 970, 885, 830, 725 cm^{-1}

MS: (4 kV, 70 eV, 300 μA , ST 210 °C)
 m/e (rel.Int.%) = 272(74), 271(55), 255(9), 254(8), 238(6), 229(5), 179(36), 166(43), 153(100), 120(21), 106(19), 91(28).

5.1.15. Isolierung von Chrysoeriol und Apigenin ("Flavon Z")

Aus den zur Isolierung von Naringenin verwendeten DC-Platten wurde die in Abb. 6, S. 15, mit Nr. 5 bezeichnete Zone ("Flavon Z") ausgekratzt und das Kieselgel dreimal 20 min mit je 20 ml Aceton p.a. auf dem Magnetrührer eluiert. Nach Filtration über eine Glasfritte G4 wurde membranfiltriert (Sartorius Typ SM, Porengröße 0.45 µm) und im Vakuum eingeeengt (22 mg Substanz).

Nach präparativer HPLC wurden die aufgefangenen Fraktionen im Vakuum einrotiert. Die Ausbeute betrug 3 mg Substanz.

5.1.16. Physikalische Daten von Chrysoeriol und Apigenin ("Flavon-Z"-Gemisch)

Chrysoeriol

(Komponente Z₁)

5,7,4'-Trihydroxy-
3'-methoxy-flavon

C₁₆H₁₂O₆ (300.27)

Apigenin

(Komponente Z₂)

5,7,4'-Trihydroxy-
flavon

C₁₅H₁₀O₅ (270.24)

R_f (DC): Z₁ 0.68 (LM III)
 Z₂ 0.58 (LM III)

UV: (MeOH): λ_{max} = 240, 252(sh), 268, 287, 237 nm

MS: (4 kV, 70 eV, 300 µA, ST 210 bzw. 240 °C)

MS-Daten siehe Tab. 25, S. 142.

Tab. 25: MS-Daten des "Flavon Z"-Gemisches

Flavon-Z- Gemisch m/e (rel. Int.%)	Chrysoeriol (Referenz) m/e (rel. Int.%)	Apigenin (Referenz) m/e (rel. Int.%)
300 (100)	300 (100)	
285 (5)	285 (6)	
272 (10)	272 (16)	
270 (45)		270 (100)
257 (23)	257 (27)	
242 (14)		242 (40)
229 (19)	229 (27)	
213 (3)		213 (10)
153 (41)	153 (41)	153 (35)
152 (16)		152 (25)
148 (16)	148 (20)	
136 (9)	136 (14)	
133 (16)	133 (23)	
124 (20)	124 (18)	124 (30)
121 (11)		121 (20)
118 (9)		118 (20)
96 (11)		96 (35)
91 (7)		91 (40)

5.2. Untersuchung von Butea monosperma

a) Extraktion

250 g der getrockneten Blüten von Butea monosperma wurden im Soxhlet 20 Stunden mit Methanol extrahiert. Nach Einengen im Vakuum bei 60 °C blieben 70 g eines orangegefärbten pulvrigen Extrakts zurück.

b) Ethylacetat-Ausschüttelung

10 g des MeOH-Gesamtextrakts wurden in EtOAc aufgenommen und dreimal gegen H₂O ausgeschüttelt. Nach Trocknen der organischen Phasen mit Na₂SO₄ wurde im Vakuum vollständig eingeeengt. Die Ausbeute betrug 0.6 g an Substanz (≅ 6 % des MeOH-Extrakts).

c) Butanol-Ausschüttelung

Die wäßrige Phase der EtOAc-Ausschüttelung wurde dreimal mit n-Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten BuOH-Phasen wurden mit Na₂SO₄ getrocknet und vollständig eingeeengt. Die Ausbeute betrug 2.5 g an gelber pulvriger Substanz (≅ 25 % des MeOH-Extrakts).

5.3. Untersuchung von Eclipta alba

a) Extraktion

500 g getrocknete oberirdische Bestandteile der Droge wurden mit 5 l Methanol im Soxhlet drei Tage extrahiert. Der nach Abrotieren von 75 % des Extraktions-

mittels verbliebene dunkelgrüne Extrakt wurde mit der gleichen Menge Wasser versetzt, worauf das Ausfallen von Ballast- und Begleitstoffen zu einer Trübung der Lösung führten. Anschließend wurde mit wenig Aktivkohle eine Minute lang auf dem Dampfbad erhitzt und nach Abkühlen filtriert. Das braungefärbte Filtrat war nach dieser Behandlung vollständig von Chlorophyll befreit.

b) Ethylacetat-Ausschüttelung

Das Filtrat aus der Extraktion wurde im Vakuum vom restlichen Methanol befreit und die nun wäßrige Lösung mit EtOAc erschöpfend ausgeschüttelt. Die vereinigten und mit Na_2SO_4 getrockneten EtOAc-Phasen ergaben 3 g an hellgrüner pulvriger Substanz.

5.4. Untersuchung von Wedelia calendulacea

Extraktion

500 g getrocknete Blätter von Wedelia calendulacea wurden im Soxhlet 3 Tage mit Ethanol 90 %, der 2 % Essigsäure enthielt, extrahiert. Der Extrakt wurde danach bis zum Abscheiden von Begleitstoffen eingeeengt. Nach Abkühlen und der Entfernung von Chlorophyll und wachsartigen Stoffen, die sich abgeschieden hatten, wurde im Vakuum eingeeengt und solange mit Ether extrahiert, bis dieser farblos blieb. Die vereinigten Etherextrakte wurden mit H_2O gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Die Ausbeute betrug 10 mg angereicherte Substanz.

5.5. Untersuchung von Lophophytum leandri (= Flor de Piedra)

Extraktion

400 g Droge wurden im Soxhlet 3 Tage lang mit Aceton extrahiert. Die Ausbeute betrug nach Einrotieren im Vakuum 15 g an dunkelbraunem Pulver.

5.6. Untersuchung von Picrorhiza kurroa

20 g der pulverisierten Droge wurden mit 400 ml Methanol unter Umschütteln 2 Stunden auf dem Dampfbad extrahiert. Nach Abkühlen wurde filtriert und das Filtrat bei 50 °C im Vakuum eingeeengt. Die Ausbeute betrug 7.5 g an pulverigem Extrakt.

5.7. Pharmakologische Untersuchungen

5.7.1. In-vivo-Lebertest an CCl₄-geschädigten Ratten

Fünf Ratten (130 - 150 g Körpergewicht) wurde je 1 ml der zu testenden Extraktlösung (380 mg/6 ml physiol. NaCl-Lösung) mit einer Schlundsonde eingeführt ($\approx$ 422 mg/kg Ratte). Als Kontrollgruppen erhielten einmal 5 Ratten auf die gleiche Weise je 0.15 ml Paraffinum subliquidum und einmal 5 Ratten je 0.15 ml Paraffin-CCl₄-Gemisch 2 : 1 ($\approx$ 531 mg CCl₄/kg Ratte).

Nach einer Stunde wurde den mit den Testextrakten vorbehandelten Tieren je 0.15 ml des Paraffin-CCl₄-Gemisches

per os eingegeben. Nach 24 Stunden erhielt jede Ratte 0.1 ml einer Hexobarbital-Natrium-Lösung (Evipan-Na^R) i.v. injiziert ($\hat{=}$ 60 mg/kg) und war sofort narkotisiert.

Die durchschnittliche Schlafdauer der Kollektive ist in Tab. 15, S. 97, aufgeführt.

Die relativen Standardabweichungen im Kollektiv lagen zwischen $\pm 2.3 \%$ und $\pm 37.5 \%$.

5.7.2. In-vitro-Test auf Leberschutzwirkung nach CCl₄- und Galactosaminschädigung nach HIKINO (90, 91)

a) Bestimmung der durch CCl₄ induzierten Leberschädigung

Nach Präinkubation (24 Stunden) wurden die nach einer modifizierten Methode nach SEGLEN bereiteten Hepatozyten (93, 94, 95) dem Medium (1.0 ml) ausgesetzt, das 10 mM CCl₄/Ethanol (0.01 ml) und die zu testende Substanz in DMSO (0.01 ml) enthielt. Nach 60 min wurde die Aktivität der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Medium gemessen (Autoanalyser RaBa super, Chugai Pharmaceutical).

b) Bestimmung der durch GalN induzierten Leberschädigung

0.1 - 0.5 mM GalN wurde im Medium (1.0 ml) gelöst, dem die zu testende Substanz in DMSO (0.01 ml) zugegeben wurde. Nach Präinkubation (1.5 Stunden) wurden die Hepatozyten dem GalN und Testsubstanz enthaltenden Medium ausgesetzt. Nach 30 Stunden wurde per Autoanalyser die Aktivität von GPT im Medium bestimmt.

c) Bestimmung einer eventuellen Leberschädigung durch Testsubstanzen

Der Versuch wurde wie unter b) beschrieben ohne Zugabe von GalN durchgeführt. Nach 30 Stunden erfolgte die Messung der GPT-Aktivität.

d) Bestimmung des direkten Einflusses von Testsubstanzen auf die GPT-Aktivität

Die Testsubstanz (0.2 mg) wurde in DMSO gelöst (2.0 μ l) und mit dem Kulturmedium verdünnt, dem ein Standardserum (2440 IU/l, 50 μ l) zugefügt war. Nach 30 min Stehenlassen bei Raumtemperatur erfolgte die Bestimmung der GPT-Aktivität.

5.7.3. Stimulierung der Polymerasen A und B nach SONNENBICHLER (50)

Das Reaktionsgemisch bestand aus 50 mM Tris/HCl, pH 7.9, 2 mM $MnCl_2$, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM Dithioerythritol, 5 - 10 μ g Kälberthymus-DNA, 1 μ Ci (3H)UTP und 0.6 mM ATP, CTP, GTP und 0.03 mM UTP. Die Reaktion wurde mit 50 μ l des geeigneten Enzymgemisches gestartet und die Testsubstanzen bei 37 °C für 25 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 % Trichloressigsäure beendet. Die Präzipitate wurden an Nitrocellulose-Filtern (Millipore, $\emptyset$ 24 mm, Porenweite 0.45 μ m) gesammelt, sechsmal mit 3 ml 5 % Trichloressigsäure gewaschen und für 10 min bei 80 °C getrocknet. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde in einem Packard Tri-Carb Szintillationszähler mit einem Toluol-Szintillator gemessen.

Durch Zugabe von α -Amanitin in den Endkonzentrationen von 2 - 150 $\mu\text{g/ml}$ konnte die Unterscheidung zwischen Polymerase A und Polymerase B getroffen werden.

Die untersuchten Extrakte und Verbindungen wurden im Konzentrationsbereich 0.01 - 10 $\mu\text{g/ml}$ getestet.

Die Polymerasen wurden nach der von MACHICAO und SONNEN-BICHLER beschriebenen Methode (50) isoliert.

5.7.4. In-vivo-Test an Phalloidin- bzw. α -Amanitin-geschädigten Mäusen (52)

10 Mäusen (25 - 30 g) wurde die zu testende Substanz in jeweils derselben Konzentration i.v. injiziert. Bei Silandrin wurde die Konzentration 35 mg/kg, bei Silymonin die Konzentrationen 50 mg/kg, 100 mg/kg und 200 mg/kg getestet. Das Applikationsvolumen betrug 10 ml/kg der in TWEEN-20 - physiol. NaCl-Lsg. (1+9) gelösten Testsubstanz.

Nach einer Stunde erfolgte die experimentelle Leberschädigung durch Injektion von 3 mg/kg Phalloidin bzw. 0.5 mg/kg α -Amanitin. Gemessen wurden die Überlebensraten der Tiere im Vergleich zu Kontrollgruppen, bei denen die Zugabe von Testsubstanz unterblieben war. Die Beobachtungszeit betrug 7 bzw. 14 Tage.

Literatur

- 1) HEGI, G., Illustrierte Flora von Mitteleuropa, Bd. VI 2, 917, Lehmanns Verlag München (1935)
- 2) HESS, H.E., LANDOLT, E. und HIRZEL, R., Flora der Schweiz, Bd. 3, 399, 429, Birkhäuser Verlag Basel (1972)
- 3) JORDAN, A. und FOURREAU, J., Brev. Pl. Nov. Savy, Paris. Fasc. 4, 62 (1866)
- 4) FIORI, A., Nuova Flora Analitica d'Italia. Tipografia di M. Ricci, Firenze, Vol. II, 774 (1929)
- 5) SZILAGYI, I., TETENYI, P., ANTUS, S., SELIGMANN, O., CHARI, V.M., SEITZ, M. und WAGNER, H., Planta Med. 43, 121 (1981)
- 6) HALIM, A.F., KHAFAGI, S.M. und GOHAR, A.A., 30. Vortragstagung der Gesellschaft f. Arzneipflanzenforschung in Graz, 12.-17. 7. 1982
- 7) JANIÁK, B. und HÄNSEL, R., Planta Med. 8, 71 (1960)
- 8) WAGNER, H., HÖRHAMMER, L. und MÜNSTER, R., Naturwissenschaften 52, 305 (1965)
- 9) WAGNER, H., HÖRHAMMER, L. und MÜNSTER, R., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 688 (1968)
- 10) WAGNER, H., SELIGMANN, O., SEITZ, M., ABRAHAM, D. und SONNENBICHLER, J., Z. Naturforsch. 31b, 876 (1976)
- 11) HALBACH, G. und TROST, W., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 24 (6), 866 (1974)
- 12) STIEBER, G., SZILAGYI, I. und TETENYI, P., Herb. Hung. 16 (2), 55 (1977)
- 13) SZILAGYI, I. und TETENYI, P., Herb. Hung. 17 (3), 65 (1978)
- 14) SHINODA, J., J. Pharm. Soc. Japan 48, 214 (1928)
- 15) PEW, J.C., Am. Chem. Soc. 70, 3031 (1948)
- 16) MARKHAM, K.R., Techniques of Flavonoid Identification, Academic Press London (1982)
- 17) KOVACIC, V., SKAMLA, J., JANIÁK, D. und KOSIKOVA, B., Chem. Ber. 102, 1513 (1969)
- 18) KALOĞA, M., Z. Naturforsch. 36b, 262 (1981)
- 19) DIESEL, P., Dissertation LMU München (1974)
- 20) HOSTETTMANN, K., Planta Med. 39 (1), 1 (1980)
- 21) TITTEL, G. und WAGNER, H., J. Chromatogr. 135, 499 (1977)
- 22) LOTTER, H. und WAGNER, H., Z. Naturforsch. 38c, 339 (1983)
- 23) HEUR, Y.H., Dissertation LMU München (1983)
- 24) PELTER, A. und HÄNSEL, R., Tetrahedron Lett. 25, 2911 (1968)
- 25) RANGANATHAN, K.R. und SESHADRI, T.R., Ind. J. Chem. 12 (8), 888 (1974)
- 26) RANGANATHAN, K.R. und SESHADRI, T.R., Ind. J. Chem. 12 (9), 993 (1974)
- 27) HÄRBORNE, J.B., MABRY, T.J. und MABRY, H., The Flavonoids, Chapman and Hall London (1975)
- 28) HESSE, M., MEIER, H. und ZEEH, B., Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme Verlag Stuttgart (1979)

- 29) FAVRE-BONVIN, J., *Tetrahedron Lett.* 43, 4111 (1978)
- 30) SELIGMANN, O., persönliche Mitteilung
- 31) ABRAHAM, D.J., TAKAGI, S., ROSENSTEIN, R.D., SHIONO, R.,
WAGNER, H., HÖRHAMMER, L., SELIGMANN, O. und
FARNSWORTH, N., *Tetrahedron Lett.* 31, 2675 (1970)
- 32) ZANAROTTI, A., *Heterocycles* 19 (9), 1585 (1982)
- 33) CAHN, R.C., INGOLD, C.K. und PRELOG, V., *Experientia*
12, 81 (1956)
- 34) GAFFIELD, W., *Tetrahedron* 26, 4093 (1970)
- 35) GEISSMAN, T.A., *The Chemistry of Flavonoid Compounds*,
Pergamon Press London (1962)
- 36) PAPPAS, S.P. und BLACKWELL, J.E., *Tetrahedron Lett.* 11,
1171 (1966)
- 37) HIRAOKA, H., *Tetrahedron* 29, 2955 (1973)
- 38) ZALKOW, L.H. und GHOSAL, M., *Chem. Comm.* 922 (1967)
- 39) SCHMID, E., FRATER, G., HANSEN, H.-J. und SCHMID, H.,
Helv. Chim. Acta 55 Fasc. 5, 1625 (1972)
- 40) GREGSON, M., OLLIS, W.D., REDMAN, B.T., SUTHERLAND, I.O.
und DIETRICH, H.H., *Chem. Comm.* 1394 (1968)
- 41) HAYWARD, E.C., TARBELL, D.S. und COLEBROOK, L.D.,
J. Org. Chem. 33 (1), 399 (1968)
- 42) KAGAN, H.B., *Stereochemistry Vol. 1, Determination of
Configurations by Spectrometric Methods*, Georg Thieme
Publishers Stuttgart (1977)
- 43) GOTTLIEB, O.R., MOURAO, J.C., YOSHIDA, M., MASCA-
RHENAS, Y.P., RODRIGUES, M., ROSENSTEIN, R.D. und
TOMITA, K., *Phytochemistry* 16, 1003 (1977)
- 44) DREWES, S.E., *Progress in Mass Spectrometry Vol. 2,
Chroman and Related Compounds*, Verlag Chemie Weinheim
(1974)
- 45) KARRER, W., *Konstitution und Vorkommen der organischen
Pflanzenstoffe*, Birkhäuser Verlag Basel (1958)
- 46) KALOGA, M., *Z. Naturforsch.* 36b, 524 (1981)
- 47) WAGNER, H., *Plant Constituents with Antihepatotoxic
Activity*, aus: J.L. Beal, E. Reinhard, *Natural Products
as Medicinal Agents*, 217, Hippokrates Verlag Stuttgart
(1980)
- 48) WIELAND, T. und FAULSTICH, H., *Critic. Review in Biochem.*
185 (1978)
- 49) SONNENBICHLER, J., MATTERSBERGER, J. und ROSEN, H.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1171 (1976)
- 50) MACHICA, F. und SONNENBICHLER, J., *Hoppe-Seyler's
Z. Physiol. Chem.* 358, 141 (1977)
- 51) HAHN, G., LEHMANN, H.D., KÜRTEN, M. und VOGEL, G.,
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 18, 698 (1968)
- 52) HALBACH, G. und TROST, W., *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*
24 (6), 866 (1974)
- 53) VOGEL, G. und TROST, W., *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*
25 (3), 392 (1975)
- 54) PURI, B. und SESHADRI, T.R., *J. Chem. Soc.*, 1589 (1955)
- 55) GUPTA, S.R., RAVINDRANATH, B. und SESHADRI, T.R.,
Phytochemistry 9, 2231 (1970)

- 56) BHARGAVA, K.K. und SESHADRI, T.R., J. Res. Indian Med. 9 (1), 9 (1974)
- 57) BHARGAVA, K.K., KRISHNASWAMY, N.R. und SESHADRI, T.R., Indian J. Chem. 8 (7), 664 (1970)
- 58) BHARGAVA, K.K., KRISHNASWAMY, N.R. und SESHADRI, T.R., Indian J. Chem. 10 (8), 810 (1972)
- 59) SARG, T.M., SALAM, N.A.A., EL-DOMIATY, M. und KHAFAGY, S.M., Sci. Pharm. 49, 262 (1981)
- 60) HALIM, A.F., BALBAA, S.I. und KHALIL, A.T., 30. Vortragstagung der Gesellschaft f. Arzneipflanzenforschung in Graz, 12.-17. 7. 1982
- 61) KHIN, M., NYUNT, N. und KHIN, M.T., Toxicol. Appl. Pharmacol. 45 (3), 723 (1978)
- 62) GOVINDACHARI, T.R., NAGARAJAN, K. und PAI, B.R., J. Chem. Soc. 15B, 629 (1956)
- 63) Produktinformation Liv. 52, The Himalaya Drug Co., Thiru-vi-ka Road, Madras 600 006, Indien
- 64) CHOPRA, R.N., NAYAR, S.L. und CHOPRA, I.C., Glossary of Indian Medicinal Plants, CSIR, New Delhi (1956)
- 65) YAMAHARA, J., MATSUDA, H., SAWADA, T., KUSHIDA, H., SHIBUYA, H. und KITAGAWA, I., Yakugaku Zasshi 102 (3), 306 (1982)
- 66) KISO, Y., SASAKI, K., OSHIMA, Y. und HIKINO, H., Heterocycles 19 (9), 1615 (1982)
- 67) ABE, H., SAKAGUCHI, M., ODASHIMA, S. und ARICHI, S., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 320 (3), 266 (1982)
- 68) MARINI-BETTOLO, G.B., Fitoterapia 2, 51 (1981)
- 69) KLOSS, P., Naturwissenschaften 54 (17), 472 (1967)
- 70) Homöopathisches Repetitorium, Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe (1981)
- 71) WEINGES, K., KOLB, R. und KLOSS, P., Phytochemistry 10, 829 (1971)
- 72) BASU, K., DASGUPTA, B. und GHOSAL, S., J. Org. Chem. 35 (9), 3159 (1970)
- 73) KITAGAWA, I., HINO, K., NISHIMURA, T., MUKAI, E., YOSHIOKA, I., INOUE, H. und YOSHIDA, T., Tetrahedron Lett. 43, 3837 (1969)
- 74) WEINGES, K., KLOSS, P. und HEHKELS, W.D., Liebigs Ann. Chem. 759, 173 (1972)
- 75) SINGH, B. und RASTOGI, R.P., Indian J. Chem. 10 (1), 29 (1972)
- 76) BASU, K., DASGUPTA, B., BHATTACHARYA, S.K. und DEBNATH, P.K., Curr. Sci. 40 (22), 603 (1971)
- 77) KRISHNAMURTI, G.V. und SESHADRI, T.R., Proc. Indian Acad. Sci. 24A, 357 (1946)
- 78) NARA, T.K., GLEYE, J., LAVERGNE DE CERVAL, E. und STANISLAS, E., Plant. Med. Phytother. 11 (2), 82 (1977)
- 79) STANISLAS, E., ROUFFIAC, R. und FOYARD, J.J., Plant. Med. Phytother. 1 (2-3), 136 (1967)
- 80) ROUFFIAC, R. und PARELLO, J., Plant. Med. Phytother. 3 (3), 220 (1969)

- 81) BRIMACOMBE, J.S., JONES, B.D., STACEY, M. und WILLARD, J.J., Carbohydr. Res. 2, 167 (1966)
- 82) SELIGMANN, O., Dissertation LMU München (1977)
- 83) GLASBY, J.S., Encyclopedia of the Alkaloids, Vol. 2, Plenum Press New York and London (1975)
- 84) PAL, S.N. und NARASIMHAM, M., J. Indian Chem. Soc. 20, 181 (1943)
- 85) BÖHLMANN, F., KLEINE, K.-M. und ARNDT, C., Chem. Ber. 97, 2125 (1964)
- 86) BÖHLMANN, F. und ZDERO, C., Chem. Ber. 103, 834 (1970)
- 87) GOVINDACHARI, T.R., NAGARAJAN, K. und PAI, B.R., J. Sci. Industr. Res. 15B, 664 (1956)
- 88) FREUDENBERG, K. und WEINGES, K., Tetrahedron 8, 336 (1960)
- 89) HIKINO, H., Vortrag auf dem Symposium "Natural Products and Drug Development", Kopenhagen, 8.-13. 8. 1983
- 90) KISO, Y., TOHKIN, M. und HIKINO, H., Planta Med., in Druck
- 91) KISO, Y., TOHKIN, M. und HIKINO, H., J. Nat. Prod., in Druck
- 92) KISO, Y., OGASAWARA, S., HIROTA, K., WATANABE, N., OSHIMA, Y., KONNO, L. und HIKINO, H., Planta Med., in Druck
- 93) SEGLEN, P.O., Methods Cell. Biol. 13, 29 (1976)
- 94) TANAKA, K., SATO, M., TOMITA, Y. und ICHIHARA, A., J. Biochem. 84, 937 (1978)
- 95) KATO, S., AOYAMA, K., NAKAMURA, T. und ICHIHARA, A., J. Biochem. 86, 1419 (1979)
- 96) KARPLUS, M., J. Chem. Phys. 30, 11 (1959)
- 97) CAHN, R.C. und INGOLD, C.K., J. Chem. Soc., 612 (1951)
- 98) MERLINI, L., ZANAROTTI, A., PELTER, A., ROCHEFORT, M.P. und HÄNSEL, R., J. Chem. Soc. Perkin I, 775 (1980)
- 99) ARNONE, A., MERLINI, L. und ZANAROTTI, A., J.C.S. Chem. Comm., 696 (1979)
- 100) TITTEL, G. und WAGNER, H., J. Chromatogr. 153, 227 (1978)
- 101) WEINGES, K., MÜLLER, R., KLOSS, S.P. und JAGGY, H., Liebigs Ann. Chem. 736, 170 (1970)
- 102) KRISHNASWAMY, N.R. und PRASANNA, S., Indian J. Chem. 8 (8), 761 (1970)
- 103) SHIMIZU, S. und HATTORI, S., Botan. Mag. 76, 59 (1963)
- 104) KRISHNASWAMY, N.R., SESHADRI, T.R. und SHARMA, B.R., Tetrahedron Lett. 35, 4227 (1966)
- 105) SELIGMANN, O. und FIEBIG, M., Vortrag auf dem Ersten Gesamtkongreß der Pharmazeutischen Wissenschaften in München, 17.-20. 4. 1983
- 106) LORENZ, D., MENNICKE, W.H., LÜCKER, P.W. und WETZELSBERGER, N., Postervortrag auf dem Ersten Gesamtkongreß der Pharmazeutischen Wissenschaften in München, 17.-20. 4. 1983
- 107) RASTOGI, R.P., SHARMA, V.N. und SIDDIQUI, S., J. Sci. Ind. Research 8B, 173 (1949)

- 108) WEINGES, K. und KUENSTLER, K., Liebigs Ann. Chem. 6, 1053 (1977)
- 109) SERRA, R.M., Anales univ. Santo Domingo 8, 295 (1944)
- 110) ROW, L.R., SRINIVASULU, C., SMITH, M. und SUBBA RAO, G.S.R., Tetrahedron Lett. 23-24, 1557 (1964)
- 111) ROW, L.R., SRINIVASULU, C., SMITH, M. und SUBBA RAO, G.S.R., Tetrahedron 22 (8), 2899 (1966)
- 112) WARD, R.S., SATYANARAYANA, P., ROW, L.R. und RAO, B.V.G., Tetrahedron Lett. 32, 3043 (1979)
- 113) ANJANEYULU, A.S.R., RAO, K.J., ROW, L.R. und SUBRAHMANYAM, C., Tetrahedron 29 (10), 1291 (1973)
- 114) CHAUHAN, J.S., SULTAN, M. und SRIVASTAVA, S.K., J. Indian Chem. Soc. 56 (3), 326 (1979)
- 115) THYAGARAJAN, S.P., THIRUNEELAKANTAN, K., SUBRAMANIAN, S. und SUNDARAVELU, T., Indian J. Med. Res. 76 (Suppl.), 124 (1982)
- 116) BULHOES, G.d.C.C., DA MOTA E SILVA, A. und MARQUES DE SA, M.A., An. Fac. Farm., Univ. Fed. Pernambuco 15, 39 (1976, Pub. 1977)
- 117) BULHOES, G.d.C.C., DA MOTA E SILVA, A., An. Fac. Farm., Univ. Fed. Pernambuco 15, 45 (1976, Pub. 1977)
- 118) CUELLAR CUELLAR, A. und ESTEVEZ, P.F., Rev. Cubana Farm. 14 (1), 63 (1980)
- 119) CHAUHAN, J.S., SULTAN, M. und SRIVASTAVA, S.K., Planta Med. 32 (3), 217 (1977)

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Herrn Prof. Dr. H. Wagner für das große Interesse an dieser Arbeit und deren stets großzügige Förderung.

Herrn Prof. Dr. F. Bohlmann, Institut für Organische Chemie der TU Berlin, für die freundliche und schnelle Durchführung der 400-MHz-NMR-Messungen.

Herrn Prof. Dr. H. Nöth, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, für die freundliche Unterstützung durch Aufnahme verschiedener NMR-Spektren.

Herrn Prof. Dr. H. Scheer, Botanisches Institut der Universität München, für die schnelle und freundliche Durchführung der CD-Messungen.

Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler, MPI Martinsried, Herrn Prof. H. Hikino, Tohoku University, Sendai, Japan, und Herrn Prof. Dr. G. Vogel, Fa. Madaus, Köln, für die zahlreichen pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. O. Seligmann für die Durchführung der chemisch-physikalischen Untersuchungen am Institut für Pharmazeutische Biologie und die wertvollen Diskussionsbeiträge.

Herrn Dr. G. Tittel für die Durchführung der Dioden Array HPLC-Messung.

Darüberhinaus möchte ich noch den vielen nicht genannten Kollegen und Institutsangehörigen danken, die in verschiedenster Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

L E B E N S L A U F

Manfred Johannes Ernst F I E B I G

geboren am 21.1.1956 in Blaubeuren
seit August 1983 verheiratet mit
Sibylle Henkel-Fiebig, geb. Henkel,
Apothekerin

Eltern: Hubert Fiebig, Städt. Angestellter
und Hermine Fiebig, geb. Richter

Schulbildung: 1962 - 1966 Volksschule Neu-Ulm
1966 - 1975 Gymnasium Neu-Ulm
Abitur im Juni 1975

Studium der Pharmazie: WS 1976/77 Phil.-Theol. Hochschule
bis Passau
SS 1977
WS 1977/78 Ludwig-Maximilians-
bis Universität München
WS 1979/80

2.Prüfungsabschnitt
der Pharm. Prüfung: Mai 1980

Pharmazie-Praktikum: Juni 1980 - Mai 1981 in der
St. Lukas-Apotheke, Neu-Ulm

Approbation: 17.8.1981

Wissenschaftliche
Tätigkeit: 1.6.1981 Beginn der vorliegenden
Arbeit unter Leitung von Herrn Prof.
Dr.H.Wagner am Institut für Pharma-
zeutische Biologie der Universität
München.
Dezember 1983 Abschluß der Promotions-
arbeit.

